

**TLEMCCEN**  
**N° d'Ordre : xxx**

**UNIVERSITÉ DE TLEMCCEN ABOU-BEKR BELKAID – FASNVSTU**  
**DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE**  
**Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie**



**THÈSE DE DOCTORAT**

**Spécialité : Biologie Moléculaire**

Présentée par :

**HAMOUDA Linda**

**Soutenue publiquement le: 28/11/2019**

**Intitulé :**

**« Evaluation de l'effet de l'anti CD20 sur la polarisation des monocytes au cours du  
diabète de type 1»**

**Sous la direction du Professeur Mourad ARIBI**

**Devant le jury composé de :**

**Pr. MOKHTARI Nassima**

**Pr. ARIBI Mourad**

**Pr. SMAHI Mohammed Chems Eddine**

**Pr. MOULESHOUL Soraya**

**Pr. SAHRAOUI Tewfik**

Université de Tlemcen, Algérie

Université de Tlemcen, Algérie

Université de Tlemcen, Algérie

Université de Sidi-Bel-Abbès, Algérie

Université d'Oran, Algérie

Présidente

Dir. de Thèse

Examineur

Examinatrice

Examineur

## RÉSUMÉ

**Introduction :** Les monocytes (MOs) sont les principales cellules phagocyte mononucléaire innée du sang et l'une des cellules effectrices les plus importantes exprimant le récepteur  $Fc\gamma$ , ce qui est crucial pour l'interaction avec le domaine Fc des anticorps. Ainsi, nous avons évalué l'effet du Rituximab (RTX), un anticorps monoclonal humain (AcM) chimérique anti-CD20, sur les activités fonctionnelles des monocytes au début de l'apparition du diabète de type 1 (DT1) humain.

**Méthodes:** Les monocytes ont été isolés à partir des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) obtenues à partir de patients volontaires avec un DT1 récent et des donneurs témoins sains.

**Résultats:** Les niveaux de production d'interleukine 6 (IL-6) étaient significativement augmentés chez les patients atteints de DT1 par rapport aux monocytes des témoins en bonne santé ( $p < 0,05$ ). De même, les taux d'IL-1 $\beta$ , d'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), de lactate déshydrogénase (LDH) et d'ions de calcium intracellulaires libres ( $_{i}Ca^{2+}$ ) ont montré une augmentation chez les monocytes des patients DT1 en comparaison avec les monocytes des témoins sains, ainsi que pour la phagocytose et la capacité de destruction des agents pathogènes, mais la différence n'a pas atteint un niveau significatif. Inversement, les niveaux de production d'IL-4 et de l'activité de la catalase étaient diminués chez les patients atteints de DT1 par rapport aux monocytes des témoins sains, mais la différence n'était pas significative pour l'activité de la catalase (respectivement  $p < 0,01$  et  $p > 0,05$ ). De plus, le traitement avec le RTX a légèrement augmenté la phagocytose et les niveaux de capacité de destruction des pathogènes (respectivement,  $p < 0,05$  et  $p > 0,05$ ), a nettement diminué la libération d'IL-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ), d'IL-6, du  $_{i}Ca^{2+}$ , du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), et légèrement réduit l'activité de l'oxyde nitrique synthase (NOS), le rapport d'activité NOS à l'arginase, la cytotoxicité à base de LDH, la production d'IFN- $\gamma$ . De plus, le traitement par RTX augmente significativement la production d'IL-4 ( $p < 0,05$ ), d'IL-10 ( $p < 0,01$ ) ainsi que l'activité de la catalase ( $p < 0,05$ ).

**Conclusions:** Notre étude a montré pour la première fois que le RTX peut inverser les activités fonctionnelles anormales des monocytes ainsi que leur production de cytokines pro-inflammatoires au début du DT1. D'un point de vue thérapeutique, le RTX pourrait être suggéré au début du DT1 pour immunomoduler l'immunité innée et les conditions inflammatoires.

**Mots-clés:** activités fonctionnelles des monocytes, phagocytose et capacités de destruction, cytokines proinflammatoires et anti-inflammatoires/régulatrices, burst respiratoire, Rituximab, diabète de type 1.

## ABSTRACT

**Background:** Monocytes are the main blood innate mononuclear phagocyte and one of the most important effector cells expressing Fc $\gamma$  receptor, which is critical for the interaction with Fc domain of antibodies. Therefore, we evaluated the effect of Rituximab (RTX, a chimeric human anti-CD20 monoclonal antibody) on the functional activities of monocytes (MOs) at the onset of human type 1 diabetes (T1D).

**Methods:** MOs were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from volunteer patients with recent-onset T1D and healthy control donors.

**Results:** The levels of the production of IL-6 were significantly increased in MOs from patients with T1D when compared to MOs from healthy controls ( $p < 0.05$ ). Similarly, interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), lactate dehydrogenase (LDH) and intracellular free calcium ion ( $_{i}Ca^{2+}$ ) levels were increased in T1D MOs than in control MOs, as well as of both phagocytosis and killing capacities, but the difference did not reach a significant level. Conversely, the production levels of IL-4 and catalase activity were decreased in MOs of T1D patients compared to MOs from healthy controls, but the difference was not significant for catalase activity (respectively,  $p < 0.01$  and  $p > 0.05$ ). Additionally, treatment with RTX slightly upregulated phagocytosis and killing capacity levels (respectively,  $p < 0.05$  and  $p > 0.05$ ), markedly downregulated the release of IL-1 $\beta$  ( $p < 0.05$ ), IL-6,  $_{i}Ca^{2+}$ , hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and slightly downregulated the nitric oxide synthase (NOS) activity, NOS activity-to-arginase activity ratio, LDH-based cytotoxicity, the production of IFN- $\gamma$ . Moreover, RTX treatment significantly upregulated the production of IL-4 ( $p < 0.05$ ), IL-10 ( $p < 0.01$ ) as well as the catalase activity ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** Our study has shown for the first time that RTX can reverse the abnormal functional activities of MOs as well as their production of proinflammatory cytokines at the onset of T1D. From a therapeutic point of view, RTX may potentially be suggested at the beginning of T1D to immunomodulate innate immunity and inflammatory conditions.

**Keywords:** functional activities of monocyte, phagocytosis and killing capacities, proinflammatory and anti-inflammatory/regulatory cytokines, respiratory burst, rituximab, type 1 diabetes.

## ملخص

مقدمة: Monocytes هي خلايا بلعمية وحيدة النواة الرئيسية للدم وواحدة من أهم الخلايا المستجيبة التي تعبر عن مستقبل Fc $\gamma$  ، وهو أمر حاسم للتفاعل مع مجال Fc للأجسام المضادة. ولذلك ، قمنا بتقييم تأثير ريتوكسيماب (RTX) ، وهو جسم حيوي أحادي النسيلة مضاد لـ CD20 على الأنشطة الوظيفية للخلايا وحيدة النواة (MOS) في بداية مرض السكري من النوع 1 (TD1).

طرق: تم عزل الخلايا أحادية النواة من خلايا الدم أحادية النواة المحيطة (PBMCs) التي تم الحصول عليها من المرضى داء السكري من النوع الأول المتطوعين والمتبرعين الأصحاء.

النتائج: تم زيادة مستويات إنتاج IL-6 بشكل ملحوظ في المرضى الذين يعانون من داء السكري من النوع الأول مقارنة مع الخلايا أحادية النواة في الضوابط الصحية ( $p > 0.05$ ). وبالمثل، مستويات انترلوكين 1 $\beta$  (IL- $\beta$ )، انترفيرون  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )، لاكتات ديهيدروجيناز (LDH) وأيونات الكالسيوم داخل الخلايا ( $Ca^{2+}$ ) أظهرت زيادة في الخلايا أحادية النواة من مرضى داء السكري من النوع الأول مقارنة بالخلايا أحادية النواة صحية الضوابط، وكذلك البلعمة والقدرة على تدمير مسببات الأمراض، ولكن الفرق لم يصل إلى مستوى كبير. وعلى العكس من ذلك ، انخفضت مستويات إنتاج IL-4 والنشاط الكاتلازمي في المرضى الذين يعانون من داء السكري من النوع الأول مقارنة مع الخلايا أحادية النواة في الضوابط الصحية ، ولكن الفرق لم يكن كبيراً لنشاط الكاتلاز (على التوالي  $p > 0.01$  و  $p < 0.05$ ). بالإضافة إلى ذلك ، زاد العلاج مع RTX زيادة البلعمة بشكل طفيف ومستويات قدرة قتل الممرض ( $p > 0.05$  و  $p < 0.05$  ، على التوالي) ، انخفض بشكل كبير IL-1 $\beta$  ( $p > 0.05$ ) ، IL-6 ،  $Ca^{2+}$  ، بيروكسيد الهيدروجين ( $H_2O_2$ ) ، وانخفاض النشاط قليلاً من سينسيز أكسيد النيتريك (NOS) ، ونسبة النشاط NOS إلى arginase ، السمية الخلوية المستندة إلى LDH ، إنتاج IFN- $\gamma$ . وبالإضافة إلى ذلك، والمعاملة مع RTX زيادة كبيرة في إنتاج IL-4 ( $p > 0.05$ ) ، IL-10 ( $p > 0.01$ ) وكذلك نشاط الكاتلاز ( $p > 0.05$ ).

الاستنتاجات: أظهرت دراستنا لأول مرة أن RTX يمكن عكس الأنشطة الوظيفية غير طبيعية من الخلايا أحادية النواة وكذلك إنتاجها من السيتوكينات الموالية للالتهابات في بداية داء السكري من النوع الأول. من وجهة نظر علاجية ، يمكن اقتراح RTX في بداية داء السكري من النوع الأول ليغير المناعة الفطرية والظروف الالتهابية.

الكلمات الرئيسية: الأنشطة الوظيفية للخلايا وحيدة النواة ، البلعمة والقدرات القتالية ، السيتوكينات المسببة للالتهاب والمضادة للالتهابات / التنظيمية ، انفجار تنفسي ، ريتوكسيماب ، داء السكري من النوع الأول

## Avant propos

Ce travail de thèse a été effectué au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie (BIOMOLIM), Université de Tlemcen, sous la direction du **Professeur Mourad ARIBI**. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance et mes plus sincères sentiments de gratitude pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour m'avoir fait confiance, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse et l'avoir dirigé durant toutes ces années. Merci mille fois pour votre rigueur scientifique, votre disponibilité, votre confiance, votre intérêt et la considération que vous avez porté à ces travaux, vos précieux conseils et orientations qui m'ont permis de mener ce travail à son terme dans les meilleures conditions, ainsi que pour votre enthousiasme et votre bienveillance.

Je remercie également l'ensemble des membres du Jury qui ont accepté de juger les travaux de cette thèse de Doctorat, en l'occurrence Madame la Professeure **MOKHTARI Nassima** (Université de Tlemcen, Algérie), Monsieur le Professeur **SMAHI Mohammed Chems-Eddine** (Université de Tlemcen, Algérie), Madame la Professeure **MOULESHOUL Soriya** (Université de Sidi Bel-Abbès, Algérie) et Monsieur le professeur **SAHRAOUI Tewfik** (Université d'Oran, Algérie). Merci pour l'intérêt que vous avez porté à cette thèse, et pour le temps que vous y avez consacré.

J'aimerais remercier vivement Melle **Maroua Miliani**. Merci pour ton aide précieuse et inconditionnelle que tu m'as apportée, car je ne compte plus toutes les heures que tu as consacré à ce travail de recherche, tu a toujours été présente pour me soutenir, m'encourager et me conseiller tout au long de l'élaboration de cette thèse. Soit persuadé de ma sincère et profonde gratitude.

Je remercie également Mme **Zineb HADJIDJ** ainsi que Mme **Sara DAHOU**, pour leur aide précieuse ainsi que pour leur disponibilité et leurs encouragements.

Un grand merci à tous les membres du Laboratoire du Pr. Mourad ARIBI et plus particulièrement: Nabila BRAHAMI, Ouahiba KHAIB dit NAIB, Chahinez TRIQUI, Warda MEZIANE, Imene BELHASSENA, Mouna NOUAR, Rabia MESSALI, Zoheir DAHMANI ainsi que Zeyneb MEKKAOUI, pour m'avoir aidé, chacun à sa façon, à l'élaboration de ce travail.

Un grand merci également au personnel du **service pédiatrique du C.H.U. de Tlemcen** ainsi qu'à toute l'équipe de **la clinique pédiatrique St Michel d'Oran** et plus particulièrement à Melle Nadia, pour leur aide précieuse lors de la récolte des prélèvements.

J'exprime toute ma reconnaissance aux patients et à leurs familles d'avoir accepté de participer à cette étude.

Je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce modeste travail.

Je remercie bien évidemment toute ma famille qui a été mon repère au cours de ce voyage.

## *Dédicaces*

*A vous deux, Ibtissem et Racha, la prunelle de mes yeux, mes princesses, ma joie de vivre, mon souffle. Vous êtes ma plus belle et ma plus grande réussite ! J'espère qu'un jour vous serez fières de moi.*

*A toi Maman et à toi papa. Vous êtes mes racines, ma force et mon équilibre. Vous m'avez transmis la persévérance, la volonté et le goût de la vie. Vous me transmettez encore toutes les valeurs qui donnent de la richesse à l'existence. Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir élevée avec le sentiment que j'étais capable de tout accomplir. Je vous serai éternellement reconnaissante de m'avoir donné la confiance et la joie de vivre pour surmonter toute les difficultés de la vie. Je vous dois tout ce que je suis.*

*A mes deux frères Ahmed et Ilies sur qui j'ai pu compter, merci pour votre présence à chaque instant et en particulier ces derniers mois. Merci pour notre complicité! Merci pour tous vos précieux conseils et votre soutien. Merci de me supporter depuis tant d'années. Je vous en suis très reconnaissante.*

*A toi Djamila. Merci pour ton soutien tes encouragements et tes précieux conseils. Merci pour ta générosité et ta bienveillance à mon égard.*

*A mes deux adorables neveux Yacin et Akram.*

*Merci à tous pour votre soutien inconditionnel, votre patience et votre compréhension lorsque le temps pour vous m'a manqué durant cette thèse. Tout ça c'est grâce à vous. Merci d'être aussi forts et d'être toujours là pour moi malgré tout. Je vous remercie pour toutes ces choses que ces mots ne disent pas.*

***Tendrement,***

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé	III
Abstract	IV
Résumé en Arabe	V
Avant-propos	VI
Table des matières	VIII
Liste des figures	X
Liste des abréviations	XI
Introduction	1
<b>Chapitre 1. Revue de la littérature</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Diabète de type 1</b>	<b>4</b>
1.1.1. Définition	4
1.1.2. Aspect clinique	5
1.1.2.1. Symptômes	5
1.1.2.2. Diagnostic	5
1.1.3. Facteurs déclenchant le diabète de type 1	6
1.1.3.1. Facteurs génétiques	6
1.1.3.2. Facteurs environnementaux	8
1.1.4. Aspect immunologique du diabète de type 1	9
1.1.4.1. Marqueurs immunologiques du diabète de type 1	9
1.1.4.2. Immunopathologie et physiopathologie du diabète de type 1	10
1.1.4.2.1. Absence de tolérance lymphocytaire	10
1.1.4.2.2. Mécanismes de destruction des cellules $\beta$ du pancréas	11
<b>1.2. Monocytes</b>	<b>14</b>
1.2.1. Définition et origine des monocytes	14
1.2.2. Hétérogénéité des monocytes	15
1.2.3. Différenciation des monocytes en macrophages	16
1.2.4. Macrophage classiquement activé et macrophage alternativement activé	17
1.2.5. Molécules de surface membranaire	19
1.2.6. Fonction et rôle des monocytes/macrophage	22
1.2.6.1. Rôle dans la réponse innée	22
1.2.6.1.1. Production d'agents microbicides	22
1.2.6.1.2. Phagocytose	25
1.2.6.1.3. Activation cellulaire et chimiotactisme	25
1.2.6.1.4. Synthèse des protéines du complément	28
1.2.6.1.5. Apoptose	28
1.2.6.1.6. Activation de l'arginase	28
1.2.6.2. Rôle dans la réponse adaptative	29
1.2.6.2.1. Cellules présentatrices d'antigènes	29
1.2.6.2.2. Activation des lymphocytes T	30
1.2.7. Monocytes/Macrophages et DT1	30
1.2.8. Arginase/monoxyde d'azote et monocytes/macrophages activés	32

---

<b>1.3. Le Rituximab (anti CD20)</b>	33
1.3.1. Définition du Rituximab	33
1.3.2. Molécule CD20	34
1.3.3. Mode d'action du Rituximab	34
1.3.3.1. Une cytotoxicité médiée par le complément (CDC)	35
1.3.3.2. Une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)	36
1.3.3.3. Un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose des cellules B	38
1.3.4. Anticorps anti-CD20 ciblant les lymphocytes B et DT1	38
<b>1.4. Problématique et objectifs</b>	41
1.4.1. Problématique	41
1.4.2. Objectifs	41
1.4.3. But	41
<b>Chapitre 2 : Le traitement au rituximab module la libération du peroxyde d'hydrogène et la production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes au début du diabète de type 1</b>	43
<b>Chapitre 3: Conclusions et perspectives</b>	57
<b>Chapitre 4 : Bibliographie</b>	60



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1.</b> Facteurs liés au développement de la maladie auto-immune	6
<b>Figure 1.2.</b> Localisation et organisation du complexe HLA sur le chromosome 6	7
<b>Figure 1.3.</b> Balance Th1/Th2	12
<b>Figure 1.4.</b> Mécanisme simplifié de destruction des cellules $\beta$ du pancréas lors d'un DT1	13
<b>Figure 1.5.</b> Origine et différenciation des monocytes et des macrophages	14
<b>Figure 1.6.</b> Hétérogénéité des monocytes et des macrophages.	15
<b>Figure 1.7.</b> Les différentes formes d'activation des macrophages	17
<b>Figure 1.8.</b> Récepteurs membranaires d'un monocyte classique	20
<b>Figure 1.9.</b> Modèle de liaison et d'internalisation des particules IgG-opsonisées par les récepteurs de type FcR.	20
<b>Figure 1.10.</b> Réaction de formation du monoxyde d'azote catalysée par les NO synthases	23
<b>Figure 1.11.</b> Le réseau des cytokines	26
<b>Figure 1.12.</b> Métabolisme de l'arginine par iNOS et arginase et les conséquences fonctionnelles sur les monocytes/macrophages	32
<b>Figure 1.13.</b> Le Rituximab.	33
<b>Figure 1.14.</b> Mécanismes d'action du Rituximab.	35
<b>Figure 1.15.</b> Cytotoxicité médiée par le complément.	36
<b>Figure 1.16.</b> Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps.	36
<b>Figure 1.17.</b> Traitement anti-CD20 et cellules B en auto-immunité.	39
<b>Figure 2.1.</b> Concept de l'étude.	44
<b>Figure 2.2.</b> Effet du Rituximab sur l'activité du NOS et de l'arginase au niveau des monocytes provenant des patients atteints du DT1 nouvellement diagnostiqué.	46
<b>Figure 2.3.</b> Effet du Rituximab sur le burst oxydatif des monocytes des patients atteints du DT1 nouvellement diagnostiqué.	47
<b>Figure 2.4.</b> Effet du Rituximab sur les niveaux d'ions libres du calcium intracellulaires dans les monocytes des patients atteints du DT1 nouvellement diagnostiqué.	47
<b>Figure 2.5.</b> Effet du Rituximab sur l'activité de la catalase dans les monocytes des patients atteints du DT1 nouvellement diagnostiqué.	48
<b>Figure 2.6.</b> Effet du Rituximab sur la production de cytokines pro-inflammatoires IL- $1\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ et IFN- $\gamma$ par les monocytes des patients atteints du DT1 nouvellement diagnostiqué.	48
<b>Figure 2.7.</b> Effet du Rituximab sur la production de cytokines anti-inflammatoire / régulatrices IL-4 et IL-10 dans les monocytes des patients atteints du DT1 nouvellement diagnostiqué.	49
<b>Figure 2.8.</b> Effet du Rituximab sur la phagocytose et la destruction des agents pathogènes par les monocytes des patients atteints du DT1 nouvellement diagnostiqué.	49
<b>Figure 2.9.</b> Effet du RTX sur la cytotoxicité à base de LDH dans les MO de DT1.	50
<b>Figure 2.10.</b> Effet du Rituximab sur le rapport de l'activité NOS à l'activité arginase dans les monocytes des patients atteints du DT1 nouvellement diagnostiqué.	50

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**A**

AcM : Anticorps monoclonale  
ADCC : Cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps  
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire  
ARN : Acide ribonucléique

**C**

°C : Celsius  
CCL : *CC-chemokine ligand*  
CCR : Récepteur à C-C chimiokine  
CD: *Clusters of differentiation*  
CDC: Cytotoxicité dépendante du complément  
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité  
CO<sub>2</sub> : Dioxyde de Carbone  
CPA : Cellule présentatrice d'antigène  
CR : *Complement receptor*  
CTL : Lymphocyte T cytotoxique (*Cytotoxic T cell*)  
CTLA-4 : *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*

**D**

DID : Diabète insulino-dépendant  
DO : Densité optique  
DT1 : Diabète de type 1  
DT2 : Diabète de type 2  
DNID : Diabète non insulino-dépendant

**E**

EDTA : Ethylène diamine tétraacétique (*ethylene diamine tetraacetic acid*)  
ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*  
eNOS : NO Synthase endothéliale

**F**

FcεRII: Récepteur de faible affinité pour l'IgE  
Fc : Fraction constante  
FcγR : Recepteur pour L'IgG

**G**

g : Gramme  
GABA  
GAD : Décarboxylase de l'acide glutamique (*glutamic acid decarboxylase*)  
G-CSF : *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*  
GM-CSF : *granulocyte colony-stimulating factor*

**H**

h: Heure  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peroxide d'hydrogene  
HCl: Acide chlorhydrique  
HLA : *Human leucocyte antigen*

HGPO: Hyperglycémie provoquée par voie orale

HbA1C: Hémoglobine glyquée

## I

IA2 : Insulinome antigène associé-2

IAA: Auto-anticorps Anti-Insuline (*insulin autoantibodies*)

ICA : Auto-anticorps anti-cellulaires des îlots (*islet cell antibody*)

IDDM : *Insulin-dependent diabetes mellitus*

$_{i}Ca^{2+}$ : *Intracellular free calcium ion*

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

iNOS : NO synthase inductible (*inductible nitric oxide synthase*)

INS : Insuline

ITAM: *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

ITIM: *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*

## K

Kd : Kilo dalton

KW : Kruskal Wallis

## L

L : Litre

LB: Lymphocytes B

LBP : *LPS-Binding Protein*

LDH: Lactate déhydrogénase

LFA : *Lymphocytes function-associated antigen*

LPS : Lipopolysaccharides

LT : Lymphocytes T

## M

M : Molaire

$\mu\text{m}$  : micromètre

$\mu\text{g}$  : microgramme

$\mu\text{mol}$  : micromole

M1 : Macrophage classiquement activé/proinflammatoire

M2 : Macrophage alternativement activé/réparateur

M-CSF : *Macrophage colony stimulating factor*

min : Minute

mL : Millilitres

MnCl<sub>2</sub> : Manganèse(II) chlorure

MO : Monocyte

M $\phi$  : Macrophage

MR: Récepteur de mannose

## N

NADPH : Nicotinamide-adenine- dinucléotide phosphate

ng: Nanogramme

NK : *Natural killer*

nm: nanomètre

nNOS : NO Synthase neuronale  
NO : Monoxyde d'azote (*Nitric Oxide*)  
NOD : *Non obese diabetic*  
NOHA : N<sup>G</sup>-hydroxy-L-arginine  
NOS : NO Synthase

**O**

O<sub>2</sub> : Oxygene  
OAT: Ornithine aminotransferase  
OCP : Complexone orthocrésolphtaléine  
ODC: Ornithine decarboxylase  
OH : Hydroxyde

**P**

PAMP : Motif moléculaire associé au pathogène (*pathogen associated molecular pattern*)  
Pb : Paire de base  
PBMCs : Cellules mononucléées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*)  
PBS : Phosphate buffered saline  
PICs : Cytokines proinflammatoires combinées  
PRR: Recepteur de reconnaissance des pathogènes

**R**

RegCs: Cytokines régulatrices combinées (regulatory cytokines)  
ROI: *Reactive oxygen intermediates*  
ROS: Espèces réactives de l'oxygène  
RPMI: Roswell Park Memorial Institute  
RTX: Rituximab

**S**

SEM: Erreur standard de la moyenne  
STAT: *Signal Transducers and Activators of Transcription*

**T**

TBET: *Trypan blue exclusion test*  
TCA: Acide trichloracétique (*trichloroacetic acid*)  
TCD : Lymphocyte T auxiliaire  
TCR : Récepteur de la Cellule T (*T Cell receptor*)  
TGF-β : Facteur de croissance transformant β (*Transforming Growth Factor-β*)  
Th1: Lymphocyte T helper de type 1  
Th17: Lymphocyte T helper de type 17  
Th2: Lymphocyte T helper de type 2  
TLR: Récepteur de type Toll (*Toll-Like Receptor*)  
TNF: Facteur de nécrose tumorale (*Tumor Necrosis Factor*)  
Treg: Cellule T régulatrice

**V**

VNTR : *Variable Number Tandem Repeat*

**Z**

Zn : Zinc

### INTRODUCTION

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune chronique, lente et évolutive, caractérisée cliniquement par une hyperglycémie due à une destruction progressive et sélective, dirigée contre les cellules  $\beta$  des îlots pancréatiques productrices d'insuline (Herold et al., 2015).

L'immunopathogénèse du DT1 est typiquement associée à l'activation de lymphocytes T (LT) autoréactifs qui sont le médiateur de la destruction des cellules bêta. Cependant, plusieurs cellules mononuclées sont également impliquées dans la destruction des cellules  $\beta$ , notamment les monocytes (MOs) et les macrophages (M $\phi$ s) (Rabinovitch and Suarez-Pinzon, 2007). Il a été rapporté que les monocytes peuvent s'infiltrer dans les îlots pancréatiques et participer à la maladie en tant que cellules pro-inflammatoires (Bradshaw et al., 2009; Yoon and Jun, 2005).

Il est à noter que les monocytes activés classiquement, associés à l'activité T helper type 1 (Th1), déclenchent une réponse inflammatoire qui initie l'insulite et la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques au cours du diabète de type 1, en utilisant plusieurs mécanismes (Bradshaw et al., 2009), notamment l'augmentation du stress oxydatif et la libération de cytokines pro-inflammatoires essentiellement l'IL-1 $\beta$  (Aribi et al., 2007), l'INF- $\gamma$  (Ysmail-Dahlouk et al., 2016) et l'IL-6 (Bradshaw et al., 2009).

Il a été démontré que l'IL-1 $\beta$  inhibe la sécrétion de l'insuline *in vitro* par les cellules des îlots de Langerhans, induit leur destruction (Bendtsen et al., 1986) et participe au processus pro-inflammatoire au début du DT1 (Aribi et al., 2007). L'INF- $\gamma$  exerce sa fonction principalement au niveau des monocytes et dans l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup> autoreactives, ce qui accélère la destruction des cellules  $\beta$  par la libération de perforines et de médiateurs cytotoxiques (granzymes) (Azar et al., 1999). De plus, l'IL-6 est impliquée dans la réponse pro-inflammatoire et est essentiellement produite par les monocytes (Calabrese and Rose-John, 2014).

À l'inverse, les monocytes alternatifs sont associés à la réponse anti-inflammatoire de type Th2, à la cicatrisation des blessures et à la résolution de l'inflammation. Ils sont induits par des glucocorticoïdes et des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4 et l'IL-10 (Semnani et al., 2011).

Il est très intéressant de noter que le Rituximab (RTX), un anticorps monoclonal (AcM) chimérique anti-CD20, est de plus en plus utilisé comme voie thérapeutique pour des troubles auto-immuns y compris le DT1 (Pescovitz et al., 2009). En effet, il cible les cellules B qui jouent un rôle pathogène en tant que cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et productrices

d'autoanticorps induisant la destruction auto-immune des cellules  $\beta$  ce qui va déclencher le processus inflammatoire du diabète de type 1 (Pescovitz et al., 2009; Rivera et al., 2001).

Plusieurs études précliniques ont démontré que les cellules B sont essentielles au développement du DT1 dans le modèle de souris NOD (*Non-Obese Diabetic*) (Serreze et al., 1996 ; Noorchashm et al., 1999). En effet, ces souris NOD déficientes en cellules B ne peuvent pas développer de DT1 (Serreze et al., 1996 ; Wong et al., 2004). De plus, les thérapies ciblées sur les lymphocytes B peuvent prévenir et inverser le diabète auto-immun (Hu et al., 2007 ; Zekavat et al., 2008). Cela a conduit à un intérêt significatif dans l'utilisation des thérapies de déplétion des cellules B en tant que traitement du DT1 (Mariño et al., 2011).

Le Rituximab joue un rôle essentiel dans l'induction de la déplétion des lymphocytes B (LB) auto-réactifs et peut également interférer avec la coopération T et la sécrétion de cytokines (Bosly, 2006). Son mode d'action peut conduire à la destruction cellulaire par un certain nombre de mécanismes indépendants: Lorsque les anticorps monoclonaux se lient à la surface de la cellule, ils peuvent provoquer une nécrose ou une apoptose ou inhiber la croissance cellulaire (Carter, 2001; Johnson and Glennie, 2003; Stern and Herrmann, 2005), par plusieurs voies de signalisation, en fonction de l'épitope ou de la cible du récepteur. Ceux ci comprennent la cytotoxicité dépendante du complément (CDC), la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC) et l'apoptose (Johnson and Glennie, 2003). Ces mécanismes sont effectués *via* des cellules effectrices telles que les monocytes en activant le Fc $\gamma$ R (Uchida et al., 2004). Ces récepteurs de la partie constante (Fc) des immunoglobulines (Ig) sont responsables de la fixation et de la phagocytose subséquente des particules revêtues d'anticorps (Ac), dites opsonisées (Ravetch, 1994 ; Leidi et al., 2009). L'activation du Fc $\gamma$ R par l'anticorps conduit la cellule effectrice (monocyte) à la phagocytose, à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et à la dégranulation de son contenu cytolytique, ce qui induit la mort de la cellule cible (Ravetch, 1997).

Cependant, nous ne savons pas encore si l'administration du RTX pourrait avoir un effet sur d'autres cellules de l'immunité, comme les monocytes. Dans ce contexte, le but de notre projet de thèse de doctorat est de vérifier si le RTX peut immunomoduler les activités fonctionnelles des monocytes et leur production de cytokines à la fois pro-inflammatoires et anti-inflammatoires au cours du DT1 d'apparition récente.

# Chapitre 1

## Revue de la littérature

<b>1.1. Diabète de type 1</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Monocytes</b>	<b>14</b>
<b>1.3. Rituximab</b>	<b>33</b>
<b>1.4. Problématique et objectifs</b>	<b>41</b>

# Chapitre 1

## Revue de la littérature

### 1.1. Diabète de type 1

#### 1.1.1. Définition

Le diabète de type 1 appelé également insulino-dépendant (DID), touche environ 10% de l'ensemble de la population diabétique. Il survient à tout âge mais il est considéré comme une maladie de l'enfance avec une incidence plus élevée chez les enfants entre 12 ans et 13 ans (Notkins and Lernmark, 2001; Knip et al., 2005).

Le DT1 est une maladie auto-immune, polygénique et chronique. Elle est caractérisée cliniquement par une hyperglycémie (un excès de glucose dans le sang) et une carence insulinique absolue (Robles and Eisenbarth, 2001), provoquées par la destruction progressive et sélective dirigée contre les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans, responsables de la sécrétion de l'insuline (Herold et al., 2015).

L'hyperglycémie par carence insulinique se manifeste lorsque pratiquement 90% de la masse des cellules bêta sont détruites (Anderson and Bluestone, 2005), car la destruction des cellules bêta est progressive, débutant plusieurs mois à plusieurs années avant la déclaration clinique de la maladie, précédée par une phase d'inflammation.

L'immunopathogénèse du DT1 est généralement associée à l'activation de lymphocytes T autoréactifs qui sont le médiateur de la destruction des cellules bêta. Cependant, il existe plusieurs autres cellules impliquées dans la destruction des cellules  $\beta$ , telles que les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et les cellules B (Rabinovitch and Suarez-Pinzon, 2007).

Ce processus auto-immun survient sur un terrain de susceptibilité génétique lié à des facteurs environnementaux.



## **1.1.2. Aspect clinique**

### **1.1.2.1. Symptômes**

Le DT1 apparaît le plus souvent de manière brutale chez l'enfant ou chez l'adolescent. Typiquement, c'est un début explosif, en quelques semaines. Dans 60 à 75% des cas, le diabète est diagnostiqué devant un syndrome cardinal typique associant une émission d'urine excessive (polyurie), diurne et nocturne, une soif intense (polydipsie) et un appétit anormalement augmenté (polyphagie). Il a aussi pour conséquence un amaigrissement rapide et massif malgré une prise de nourriture abondante (incapacité à métaboliser le glucose) et une hyperglycémie supérieure à 2g/l avec parfois présence d'acétone dans les urines et d'une haleine «de pomme reinette» caractéristique (Lai et al., 2005). Une fatigue plus ou moins prononcée qui ne tarde pas à apparaître. Le jeune âge du patient est également un élément d'orientation.

Il est rare que le diabète soit découvert fortuitement. Dans 25 à 40% des cas le diagnostic est fait devant une complication comme une acidocétose où l'interrogatoire nous permet de retrouver souvent un syndrome polyuro-polydipsique plus ou moins important négligé par les parents, une déshydratation chez un nourrisson et un coma hyperosmolaire sans cétose.

La maladie est également caractérisée par diverses complications vasculaires, qui peuvent se manifester par des accidents vasculaires cérébraux, une insuffisance rénale, une cécité et une insuffisance cardiaque.

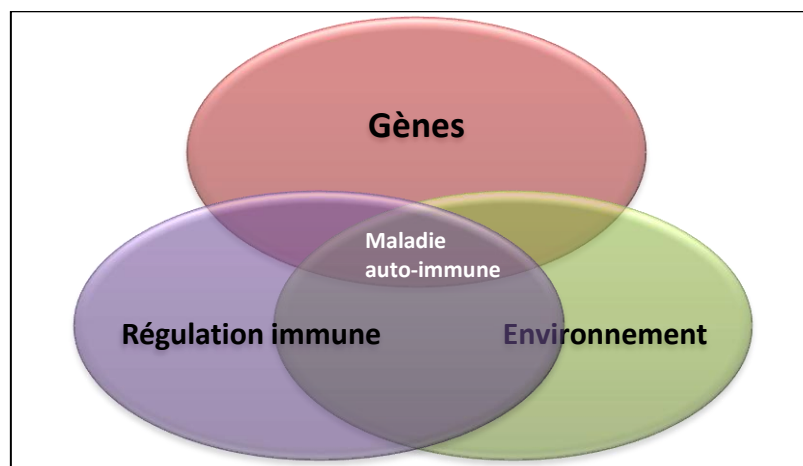
### **1.1.2.2. Diagnostic**

Le diagnostic du DT1 repose sur les antécédents médicaux de la personne (les symptômes et les autres troubles de santé) et sur les résultats d'analyses d'urine et de sang. Les analyses d'urine révèlent la présence du glucose ou de corps cétoniques (déchets provenant de la dégradation des graisses et des protéines), tandis que les analyses de sangs permettent de déceler la concentration du glucose dans le sang. Une glycémie à jeun  $\geq 1.26\text{g/l}$  (7mmol/l), contrôlée à 2 reprises, ou une glycémie  $\geq 2\text{g/l}$  (11.1mmol/l) quelque soit l'heure, ou une glycémie temps 120 min de l'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO)  $\geq 2\text{g/l}$ .

La présence d'anticorps anti ilots permet de confirmer ce diagnostic, ainsi que la mesure de l'hémoglobine glyquée (HbA1C), qui doit être en moyenne de 11% au moment de la découverte du diabète mais elle est essentiellement un moyen de surveillance.

### 1.1.3. Facteurs déclenchant le diabète de type 1

Comme toute maladie auto-immune, le DT1 est une pathologie multifactorielle prédisposée sous l'effet de l'interaction de facteurs environnementaux avec un certain nombre de variantes de gènes qui entraîne un trouble du système immunitaire et provoque la condition (**figure 1.1**).



**Figure 1.1. Facteurs liés au développement de la maladie auto-immune.**

#### 1.1.3.1. Facteurs génétiques

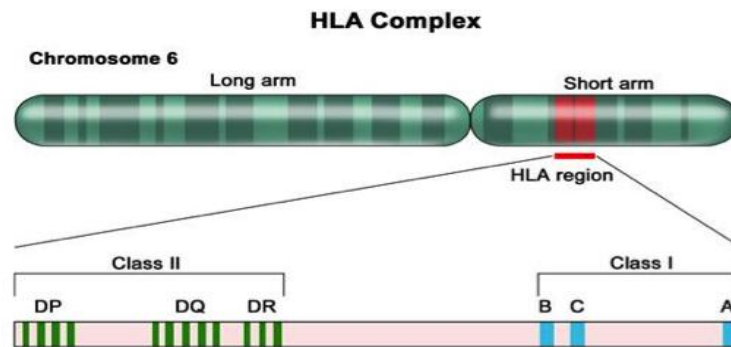
Le déterminisme du DT1 est polygénique et sa transmission ne répond pas à un schéma simple. L'existence d'un terrain de susceptibilité génétique au DT1 a été mise en évidence par un taux de concordance plus élevé chez les jumeaux monozygotes (25 à 30%) que chez les dizygotes (5 à 10%) (Hyttinen et al., 2003; Kaprio et al., 1992; Olmos et al., 1988). Par ailleurs, lorsque l'un des deux parents est diabétique de type 1, le risque de transmission à la descendance est de l'ordre de 5 %, plus précisément 6 % si le père est diabétique et 3 % si c'est la mère (mais 30 % si les 2 parents le sont) (Redondo et al., 1999). Cette différence entre risque paternel et maternel serait liée à des facteurs protecteurs maternels, comme la transmission d'anticorps à travers le placenta ou l'allaitement (Kahn, 2002).

Il existe une vingtaine de régions génétiques associées à une susceptibilité à la maladie, d'IDDM1 à IDDM20 (*Insulino-Dependent Diabète Mellitus*).

❖ **Gène HLA (IDDM1)**

La contribution du gène du complexe majeure d'histocompatibilité (CMH) (appelé IDDM1) situé dans la région HLA (*human leukocyte antigen*) de classe II sur le Chromosome 6 (6p21) (**figure 1.2**), rend compte de 50% de la susceptibilité génétique de la maladie (Wen et al., 2000). Il contient les gènes codants pour les molécules DR, DQ et DP, dont la fonction est de présenter les peptides antigéniques aux LT CD4.

La plupart des enfants (95%) et des adultes (80%) ayant un DT1, sont HLA DRB1\*03 et/ou DRB1\*04 (Cudworth and Woodrow, 1975). En effet, les personnes hétérozygotes DR3/DR4 sont exposées à un risque 10 à 20 fois supérieur de développer la maladie que la population générale, ce qui suggère un effet synergique de ces 2 allèles. Par contre, les personnes ayant hérité de la variante DRB1\*02 semblent bénéficier d'une forte protection contre le DT1 (Erlich et al., 2008; Ueda et al., 2003).



**Figure 1.2. Localisation et organisation du complexe HLA sur le chromosome 6 d'après (Klein and Sato, 2000).**

❖ **Gène de l'insuline (IDDM2)**

Le gène de l'insuline (INS) (IDDM2), localisé sur le chromosome 11 (11p15), correspond au deuxième facteur génétique de susceptibilité, contribuant à 10% de susceptibilité génétique au DT1 (Lillioja et al., 1993). Plusieurs classes d'allèles du VNTR (*variable number of tandem repeat*) peuvent être définies dans la région promotrice du gène, qui a des capacités transcriptionnelles différentes (Kahn, 1995). Les allèles de classe I prédisposent au DT1, leur présence à l'état homozygote augmente le risque de diabète, même chez les sujets qui n'expriment pas les haplotypes DR3 ou DR4. A l'inverse les allèles de classe III ont un effet protecteur et cette protection est dominante (Geenen et al., 2005; Knerr et al., 2005).

D'autres gènes de susceptibilité pour le diabète type 1 ont été décrits tels que le gène CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*) correspondant au IDDM12 (Arafa et al., 2015), mais leur rôle physiopathogénique est moins explicite.

### 1.1.3.2. Facteurs environnementaux

Une augmentation si rapide de l'incidence ne peut pas être liée seulement à des variations génétiques, mais également à des variations environnementales. Parmi ces modifications, celles qui sont associées aux premières années de vie, ont été particulièrement étudiées.

- **Environnement prénatal** : L'âge maternel avancé (> 35 ans) et la croissance excessive du poids du fœtus pendant la grossesse mais aussi pendant le premier et le deuxième mois après la naissance, présentent des facteurs de risque dans la pathogénie du DT1 (Elfving et al., 2008).

- **Facteurs alimentaires** : L'introduction précoce de protéines du lait de vache chez des enfants à risque génétique de DT1, pourrait constituer un facteur de risque du DT1. Par ailleurs, d'autres facteurs alimentaires ont été invoqués, tels que l'introduction précoce de céréales chez l'enfant avant l'âge de 4 mois. Le risque de développer des anticorps contre les cellules  $\beta$  pancréatiques serait multiplié par cinq chez les enfants exposés au gluten avant d'atteindre l'âge de 4 mois (Lévy-Marchal, 2010).

- **Les infections** : L'infection par différents pathogènes viraux et bactériens a été proposée depuis longtemps comme l'une des étiologies du diabète auto-immune (Goldberg and Krause, 2009). Certaines épidémies virales (virus coxsackies) pourraient être à l'origine du DT1 (Viskari et al., 2005). En effet, l'ARN (Acide ribonucléique) du virus coxsackie est détecté plus fréquemment dans le plasma des enfants présentant un DT1 (Viskari et al., 2005). Les infections à entérovirus au cours de la grossesse pourraient constituer un facteur de risque de DT1 chez l'enfant (Viskari et al., 2005). De plus ces entérovirus ont été détectés plus souvent chez les enfants diabétiques que chez les enfants non diabétiques de mêmes parents (Kojo et al., 2003; Luppi et al., 1999).

- **Vitamine D** : Une carence en vitamine D constitue un des facteurs de risque environnementaux du DT1. Ceci peut être dû aux effets immunomodulateurs de la vitamine D sur le processus auto-immun responsable de la destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques (Danescu et al., 2009).

- **Le stress** : Le DT1 peut être causé par des stress physiologiques et psychologiques, provoquant une augmentation de production du glucose qui va stimuler fortement les cellules  $\beta$  productrices d'insuline. Ces cellules se nécrosent et déclenchent une réaction immunitaire par l'apparition d'auto-anticorps qui détruisent les cellules  $\beta$  nécrosées (Gosselin, 2000).

## **1.1.4. Aspect immunologique du diabète de type1**

### **1.1.4.1. Marqueurs immunologiques du diabète de type1**

Plusieurs auto anticorps dirigés contre certains Ag pancréatiques ont été identifiés et servent à diagnostiquer cliniquement le DT1, dans des cas ambigus. Ils servent également à prévoir le DT1 chez les individus non diabétiques (Aribi, 2011). En effet, ces auto-anticorps, peuvent apparaître plusieurs années avant le début clinique du diabète et ont une valeur prédictive de la survenue de la maladie chez des sujets à risque (Côte-Real et al., 2009). Ainsi, lorsque plusieurs auto-anticorps sont présents simultanément, le risque de survenue de la maladie dans les cinq années à venir atteint 100 %. Les auto-anticorps d'îlot les plus utilisés incluent l'ICA (Auto-anticorps anti-cellules des îlots), l'IAA (Auto-anticorps anti-insuline), le GADA (Auto anticorps anti-acide-glutamique décarboxylase), l'IA-2A (Insulinome antigène associé -2) et les auto-anticorps anti-transporteur 8 du Zinc (Achenbach et al., 2004).

#### **➤ Auto-anticorps anti-cellules des îlots (ICA)**

Les ICA ont été les premiers marqueurs immunologiques décrits au cours du DT1. Ils peuvent apparaître 10 ans avant que les signes cliniques du DT1 apparaissent (Riley and Sliwowski, 2000). Environ 88% des enfants ayant un DT1 présentent des ICA au moment du diagnostic (Bingley et al., 1997). Les ICA disparaissent en quelques années, plus rapidement chez l'enfant que chez l'adulte (Pietropaolo et al., 2005; Siljander et al., 2009; Taplin and Barker, 2008).

#### **➤ Auto-anticorps anti-insuline (IAA)**

Des anticorps dirigés contre l'insuline peuvent être détectés chez des sujets ayant un DT1. Environ 69% des enfants diabétiques sont porteurs de ces auto anticorps et semblent être les premiers détectables chez les enfants à haut risque génétique porteurs de l'allèle HLA-DRB1\*04 (Horie et al., 2010; Siljander et al., 2009).

#### **➤ Auto anticorps anti-acide-glutamique décarboxylase (GADA)**

GAD est une enzyme qui catalyse la décarboxylation du glutamate en GABA et CO<sub>2</sub>. Chez les mammifères, GAD existe sous deux isoformes codées par deux gènes différents GAD1 et GAD2 (Dubois-Laforgue, 2007). Ces isoformes sont GAD67 et GAD65 avec des poids moléculaires de 67 et 65 kDa respectivement. Elles sont exprimés dans le cerveau où GABA est utilisé comme un neurotransmetteur, GAD65 est aussi exprimé dans le pancréas (Bhalla et al., 1983). Leur présence a été montrée chez environ 61% des patients ayant un DT1 (Knip et al., 2005), dont la plupart sont également porteurs d'IA2 (Ludvigsson, 2009; Zimmet, 1996).

### ➤ **Insulinome Antigène associé -2 (IA2)**

Le criblage de banques d'expression d'ADNc, a permis d'identifier une protéine de la famille des tyrosines-phosphates (Lu et al., 1996). Cette protéine de 980 acides aminés est localisée sur la membrane des granules de sécrétion des cellules des îlots et des tissus d'origine neuroendocrinienne (Xie et al., 1997). Les 200 acides aminés de l'extrémité C-terminale de la protéine, qui constituent le domaine intracellulaire, représentent la cible majeure pour les anticorps (Bonifacio et al., 1998). Il a été suggéré que 70 % des patients présentant un DT1 de découverte récente présentent des auto-anticorps anti-IA-2 (Dubois-Laforgue, 2007).

### ➤ **Auto-anticorps anti-transporteur 8 du Zinc (ZnT8)**

Un nouveau marqueur du DT1 a été mis en évidence, le transporteur de zinc spécifique des cellules  $\beta$  humaines (ZnT8). Ce dernier est exprimé par les îlots pancréatiques. En effet, des auto-anticorps anti-ZnT8 étaient détectés chez des patients diabétiques type 1 nouvellement diagnostiqués (Yang et al., 2010).

### ➤ **Autres auto-anticorps**

Des anticorps dirigés contre la protéine insulaire p69, le transporteur de glucose GLUT-2, la protéine mitochondriale Glim-38, ou encore la protéine IMOGEN issue des granules de sécrétion, ont été rapportés chez des sujets ayant un diabète de type 1 (Inman et al., 1993; Tree et al., 2000). Plus récemment, d'autres auto anticorps ont été décelés tels que les anti-SIC30A8 (Wenzlau et al., 2008), et les anti-PDX-1 (Luzardo and Mathews, 2010).

## **1.1.4.2. Immunopathologie et physiopathologie du diabète de type 1**

### **1.1.4.2.1. Absence de tolérance lymphocytaire**

Le DT1 résulte d'une destruction des cellules  $\beta$  par un processus auto-immun. L'origine du déclenchement de cette réponse auto-immune demeure inconnue. Toutefois, il a été observé qu'un dysfonctionnement thymique et une absence de tolérance vis-à-vis des cellules  $\beta$  pancréatiques pendant le développement des lymphocytes T au niveau du thymus, étaient responsables du développement d'une réponse auto-immune spécifique de la cellule  $\beta$  (Geenen et al., 2005; Liston et al., 2003; Willcox et al., 2009). En effet, pendant le développement lymphocytaire, la plus part des LT auto-réactifs sont éliminés dans le thymus, un processus appelé « sélection négative » (Ohashi, 2002). Cependant, certains d'entre eux échappent à la suppression thymique et migrent vers la périphérie (Klein and Kyewski, 2000).

Ces LT auto-réactifs (spécifiques des cellules  $\beta$ ) doivent tout d'abord être « activés » pour être capables d'envahir les îlots de Langerhans (Matzinger, 2002). Par ailleurs, durant la période néonatale, le renouvellement des cellules des îlots de Langerhans est accru, de même que leur mort physiologique ou l'apoptose (Klein and Kyewski, 2000). Durant cette période de mort physiologique des îlots de Langerhans, certains sujets excrètent l'antigène des cellules  $\beta$  qui peut rencontrer des LT spécifiques des cellules  $\beta$ .

Dans des conditions particulières, dictées par la constitution génétique et la susceptibilité d'un sujet, les LT spécifiques des cellules  $\beta$  peuvent être activés et infiltrer les îlots de Langerhans. Ensuite, ces lymphocytes activés, conjointement à d'autres leucocytes, détruisent les îlots de Langerhans, entraînant le diabète clinique (Trudeau et al., 2000; Turley et al., 2003).

#### **1.1.4.2.2. Mécanismes de destruction des cellules $\beta$ du pancréas**

La physiopathologie du DT1 résulte d'une destruction des cellules  $\beta$  par un processus auto-immun, consécutif à l'infiltration des îlots de Langerhans par des cellules mononuclées au sein du pancréas (Bottazzo et al., 1974; Dubois-Laforgue, 2007; In't Veld, 2011; Willcox et al., 2009). Les monocytes et les macrophages sont parmi les premières cellules à infiltrer les îlots de Langerhans et semblent être impliquées à un stade très précoce dans la pathogenèse du DT1 (Seay et al., 2016; Willcox et al., 2009). Au cours de cet événement, les molécules d'adhésion (sélectines et intégrines), jouent un rôle important dans l'infiltration des cellules vers les sites inflammatoires. Un traitement des souris NOD par des anticorps dirigés contre ces molécules prévient le développement de l'insulite, et par conséquent le DT1 (Yang et al., 1996).

Les mécanismes de destruction des cellules bêta du pancréas sont générés par un dysfonctionnement immunitaire réglementé par la balance Th1/Th2. Une surproduction de cytokines pro-inflammatoires Th1, ayant des propriétés toxiques provoquant des dommages aux cellules  $\beta$  pancréatiques, active la réponse cellulaire (cytotoxique et inflammatoire) et inhibe les fonctions Th2 (Aribi et al., 2007).

Les cellules Th2 produisent des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9, l'IL-10 et l'IL-13, qui activent l'immunité humorale pour assurer la production d'anticorps par les lymphocytes B (Azar et al., 1999).

Les cytokines produites par chacune des populations Th1 et Th2 exercent une action inhibitrice sur les fonctions de différenciation et de synthèse de l'autre population cellulaire (**Figure 1.3**) (Mosmann and Coffman, 1987). Lors du DT1, l'équilibre de cette balance

Th1/Th2 est généralement rompu en faveur d'une réponse immunitaire exacerbée de type Th1 (Overbergh et al., 2000; Walker and von Herrath, 2016; Yoon and Jun, 2005).

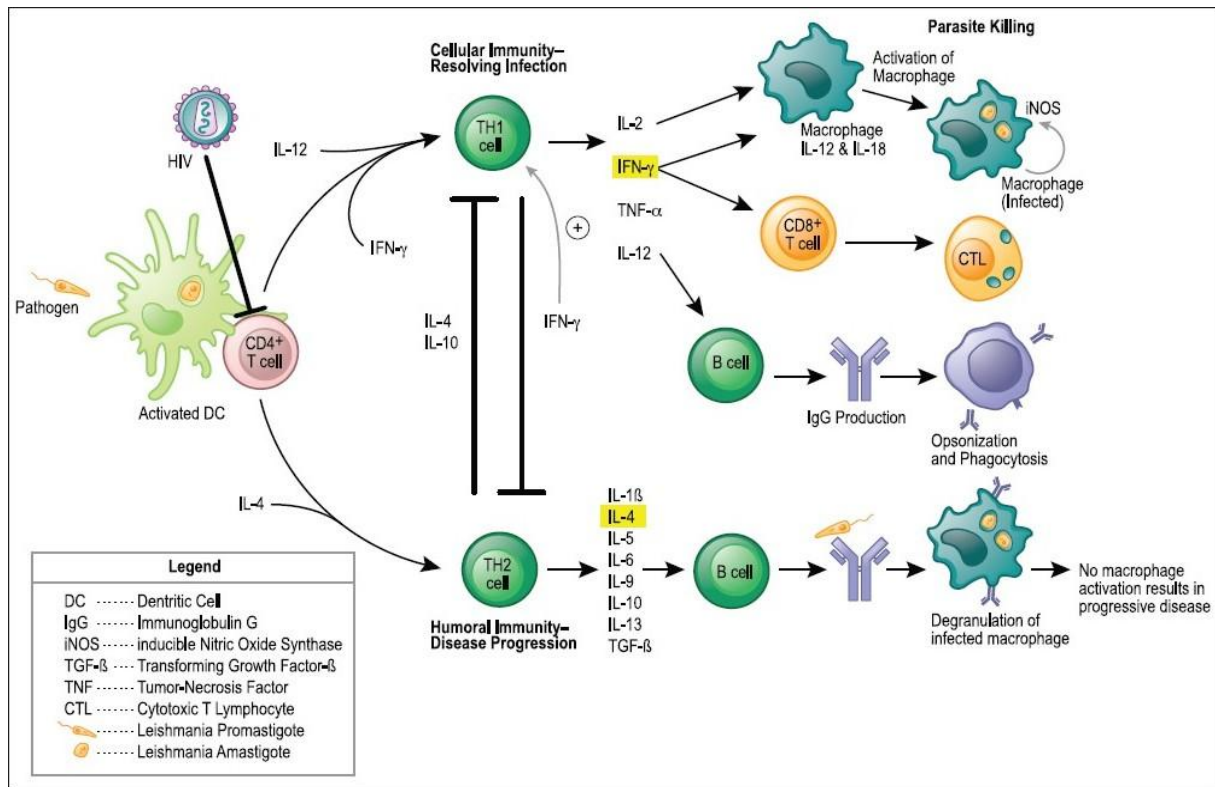
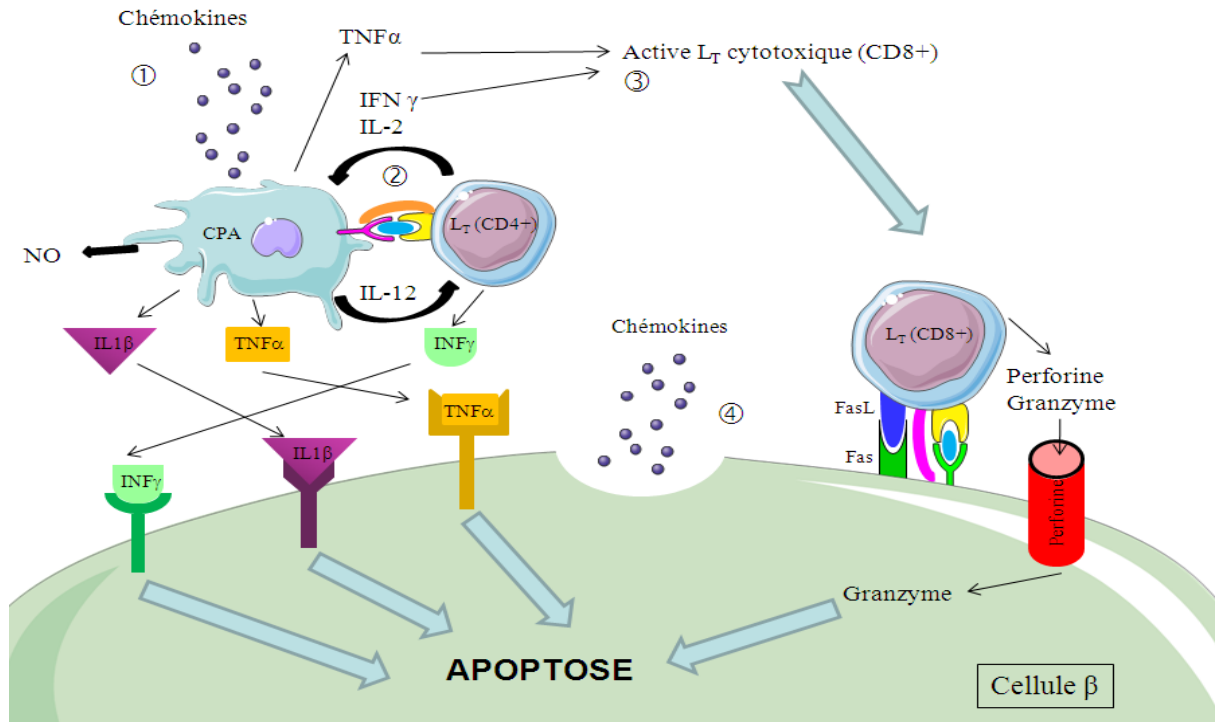


Figure 1.3. Balance Th1/Th2 (Ezra et al., 2010).

En effet, la cellule présentatrice d'antigène (CPA) (monocytes, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B), présente le peptide antigénique au lymphocyte TCD4 et libère l'IL-12 qui stimule les LT CD4 de type Th1 (figure 1.4). De plus, l'activation de ce dernier nécessite l'interaction spécifique d'une part, entre son récepteur TCR (*T Cell Receptor*) et le complexe peptide pancréatique-CMH II et d'autre part, entre des molécules co-activatrices B7 et CD28 (Dubois-Laforgue, 2007).

Par ailleurs, les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) sont activés suite à l'interaction de leurs TCR avec les auto-antigènes pancréatiques, présentés par les molécules du CMH-I au niveau des cellules pancréatiques (Aribi, 2011).





**Figure 1.4. Mécanisme simplifié de destruction des cellules β du pancréas lors d'un DT1 modifié d'après (Pirrot et al., 2008).**

Les cytokines IL-2 et IFN- $\gamma$  de type Th1, majoritaires chez le DT1, induisent l'activation de lymphocytes TCD8<sup>+</sup> cytotoxiques et les macrophages infiltrés, accélérant la destruction  $\beta$ -cellulaire par la libération de perforines et de granzymes, la production du TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor) et de médiateurs solubles cytotoxiques ainsi que par des interactions Fas-FasL (Aribi, 2011; Azar et al., 1999; Wällberg and Cooke, 2013). De plus, il a été démontré que les cytokines proinflammatoires (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et TNF- $\beta$ ), produites par les macrophages, recrutés au sein de l'insulite, sont cytotoxiques pour les cellules des îlots du pancréas et bloquent la synthèse et la sécrétion de l'insuline (Aribi, 2011; Bendtzen et al., 1986; Espinoza-Jiménez et al., 2012). L'IL-1 $\beta$  provoque l'apoptose des cellules  $\beta$  qui expriment le récepteur de l'IL-1 $\beta$  (Aribi et al., 2007; Lehuen et al., 2010). Ces cytokines semblent être également impliquées dans l'augmentation de la production des radicaux libres (NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>) par les cellules inflammatoires (Kolb and Kolb-Bachofen, 1992).

De ce fait, la destruction spécifique des cellules pancréatiques n'est observée que lorsque les lymphocytes infiltrant les îlots produisent des cytokines de type Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\beta$ ). A l'inverse, les cytokines de type Th2 semblent avoir un effet plutôt protecteur contre la destruction des cellules  $\beta$  (Ko et al., 2001; Suarez-Pinzon and Rabinovitch, 2001), en inhibant la production de cytokines de type Th1 (Sadelain et al., 1990; Wang et al., 1992).

## 1.2. Monocytes

### 1.2.1. Définition et origine des monocytes

C'est un leucocyte qui appartient au système des phagocytes mononucléés et est capable de se différencier en macrophages (Mφs), cellules dendritiques et ostéoclastes (Geissmann et al., 2003; Randolph et al., 1999; Varol et al., 2007). Les monocytes sont des cellules de 12 à 15 μm de diamètre alors que les macrophages peuvent mesurer de 25 à 50 μm. Les deux cellules ont un noyau en position excentrique rond ou ayant la forme d'un rein. Les monocytes possèdent un ou deux nucléoles qui se perdent lors de la différenciation en Mφ. Ils ont tous deux un cytoplasme abondant. Leur membrane est ondulée. Les monocytes/Mφs adhèrent au plastique et au verre, concentrant ainsi les organelles au centre de la cellule. Les monocytes/Mφs ont également plusieurs lysosomes situés près de la membrane cytoplasmique qui peuvent se lier aux phagosomes. Le cytosquelette du Mφ, formé de microtubules et de microfilaments d'actine, est très bien développé et permet sa locomotion de même que la formation de pseudopodes lors de la phagocytose (McGee and Lewis, 1992).

Les monocytes sont produits dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes qui se transforment en progéniteurs myéloïdes (Mosser and Edwards, 2008). Ils passent par diverses étapes de maturation dans la moelle osseuse (**figure 1.5**) et sont libérés vers le sang sous l'effet de chimiokines spécifiques (Geissmann et al., 2008; Serbina et al., 2008).

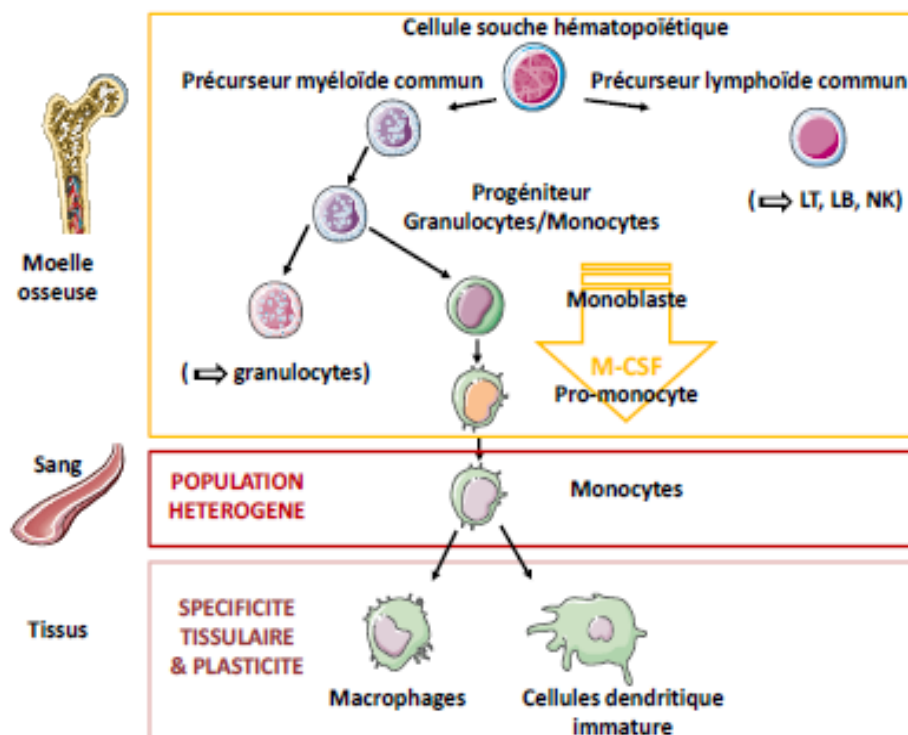


Figure 1.5. Origine et différenciation des monocytes et des macrophages (Galès, 2009).

Chez l'homme, les monocytes représentent environ 10 % des leucocytes du sang circulant (Auffray et al., 2009). Ils circulent dans le sang durant 1 à 3 jours avant de migrer, sous l'action des facteurs chimioattractants, dans les tissus où ils se différencient en macrophages ou en cellules dendritiques (Auffray et al., 2009; Mosser and Edwards, 2008; Wiktor-Jedrzejczak and Gordon, 1996).

Le monocyte joue un rôle important au cours des réponses inflammatoires (Geissmann et al., 2008; Serbina et al., 2008) et immunitaires innées (Auffray et al., 2007). Il contribue également à l'homéostasie cellulaire en détruisant les cellules apoptotiques et les composés toxiques (Franc et al., 1996; Williams, 2007). De par ses différents rôles physiologiques, le monocyte est également impliqué dans la pathogenèse des maladies inflammatoires chroniques (Libby et al., 2008).

### 1.2.2. Hétérogénéité des monocytes

Les premiers constats d'une hétérogénéité de la population monocyttaire étaient basés sur leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles. Les données actuelles sur cette hétérogénéité définissent trois sous-populations majeures de monocytes dans le sang périphérique humain, sur la base de l'expression différentielle des marqueurs de surface CD16 (Fc $\gamma$ RIII) et CD14 (récepteur lipopolysaccharides (LPS)): Les monocytes classiques CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup>, intermédiaires CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> et non classiques CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup> (**Figure 1.6**) (Mukherjee et al., 2015; Ziegler-Heitbrock et al., 2010).

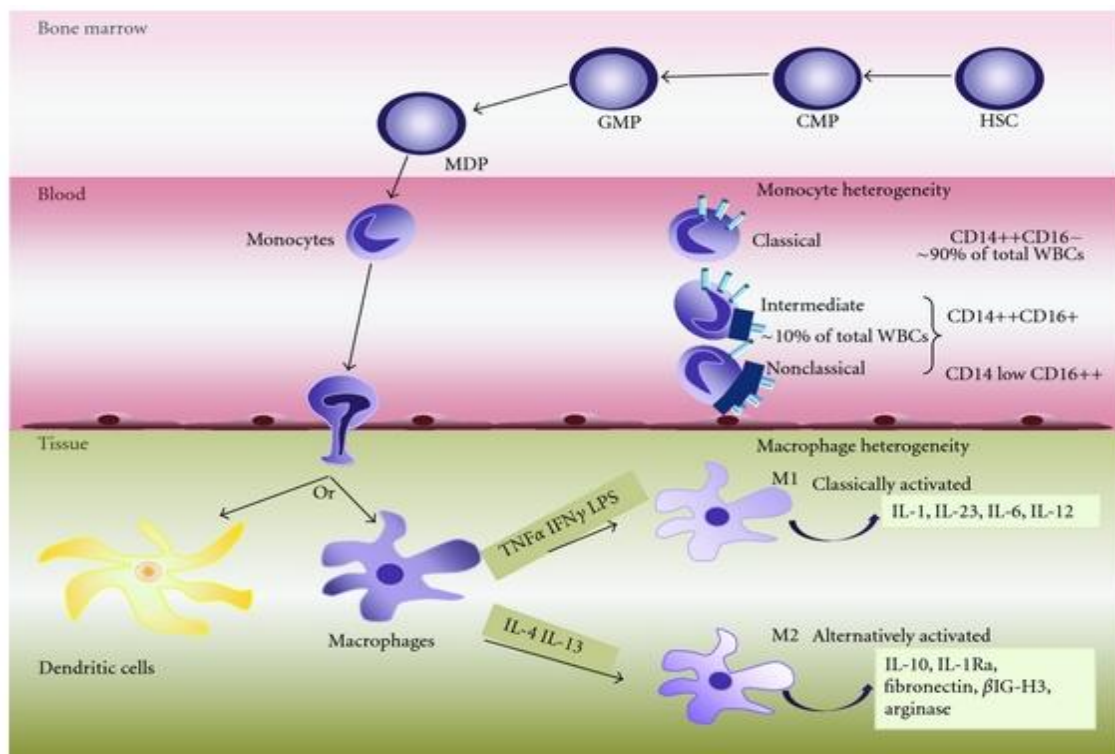


Figure 1.6. Hétérogénéité des monocytes et des macrophages (Liaskou et al., 2012).

Ces monocytes diffèrent essentiellement par leur expression des récepteurs de chimiokines, de l'activité phagocytaire et de la distribution tissulaire lors d'une inflammation (Wong et al., 2011). Par conséquent, ils sont impliqués de façon différentielle dans la pathophysiologie de l'inflammation, de l'athérosclérose et de la régénération après une blessure (Hristov and Weber, 2011).

- **Les « Monocytes classiques » dits « inflammatoires »** ( $CD14^{++} CD16^{-}$ ), représentent 85% des monocytes circulants, avec une expression importante du marqueur CD14 et du récepteur CCR2 mais un faible taux d'expression du marqueur CD16 et du récepteur CX3CR1 (Gordon and Taylor, 2005; Yang et al., 2014). De plus, cette sous-population a une forte capacité phagocytaire et produit de l'IL-10 et du TNF- $\alpha$  en réponse aux lipopolysaccharides (LPS) ainsi que l'IL-1 et l'IL-6 (Cros et al., 2010).
- **Les « monocytes non-classiques » ou « alternatifs »** ( $CD14^{+} CD16^{++}$ ), représentent 10 % des monocytes circulants (Wong et al., 2012). Contrairement aux précédentes cellules ( $CD14^{++} CD16^{-}$ ), ces monocytes expriment faiblement le récepteur CCR2 et fortement le récepteur CX3CR1 (Yang et al., 2014). En réponse au LPS, ces cellules ont une activité de phagocytose pauvre et produisent des cytokines en très faibles quantités, comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-8, et l'IL-6 (Wong et al., 2012).
- **Les « monocytes intermédiaires »** ( $CD14^{++} CD16^{+}$ ), représentent 5 % des monocytes circulants. Ces cellules expriment les récepteurs CCR2 et CCR5. Ces monocytes expriment fortement le CD80, le CD86 et HLA-DR et sont, par conséquent, dotés de fonctions inflammatoires et sont fortement impliqués dans la présentation antigénique et l'activation des lymphocytes T (Wong et al., 2012). Suite à une stimulation par le LPS, ces monocytes sécrètent de l'IL-1 $\beta$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 et possèdent également une importante capacité à produire des espèces réactives de l'oxygène (Rossol et al., 2012).

### 1.2.3. Différenciation des monocytes en macrophages

La différenciation des monocytes en macrophages est sous le contrôle de facteurs de croissances GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) et M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) (Rey-Giraud et al., 2012). L'équilibre entre ces deux facteurs, module l'état de polarisation des macrophages, avec une orientation des macrophages vers le phénotype classiquement activé M1 par le GM-CSF et macrophage alternativement activé M2 par le M-CSF (Vogel et al., 2014). Au cours de ce processus, les monocytes sont exposés à différentes cytokines comme INF- $\gamma$  ou IL-4. Après une stimulation

par les différents signaux environnementaux, les macrophages atteignent leur phénotype mature (Rey-Giraud et al., 2012; Tamoutounour et al., 2013).

Les macrophages ont une demi-vie longue de plusieurs jours à plusieurs mois (Bosque et al., 1997). Il faut distinguer les macrophages récemment dérivés des monocytes sanguins dans un contexte inflammatoire (cellules activées), des macrophages résidents participant à l'homéostasie dans les tissus (Kennedy and Abkowitz, 1998, 1997; Rey-Giraud et al., 2012). Ces cellules acquièrent certaines particularités en fonction de leur microenvironnement tissulaire. Ainsi, certains macrophages ont des capacités qui leur sont propres tout en conservant des propriétés communes comme la capacité de produire de grandes quantités de médiateurs de l'inflammation notamment des cytokines pro-inflammatoires. C'est notamment le cas des macrophages alvéolaires pulmonaires, des cellules microgliales du système nerveux central, des cellules ostéoclastiques des os, des cellules de Küpffer du foie ou encore des cellules macrophagiques des organes hématopoïétiques (Brüne et al., 2013).

#### 1.2.4. Macrophage classiquement activé et macrophage alternativement activé

Les macrophages jouent un rôle clé dans le système immunitaire, à la fois en tant que cellules effectrices et antimicrobiennes, mais aussi comme cellules immuno-régulatrices, qui induisent, suppriment et modulent les réponses immunitaires adaptatives (Rath et al., 2014). L'environnement cytokinique, produit par les LT lors d'une réponse immune acquise, a pour conséquence la polarisation des macrophages en phénotypes M1 et M2, reflétant respectivement les phénotypes Th1 et Th2 (Cabrera-Fuentes et al., 2015) (**figure 1.7**).

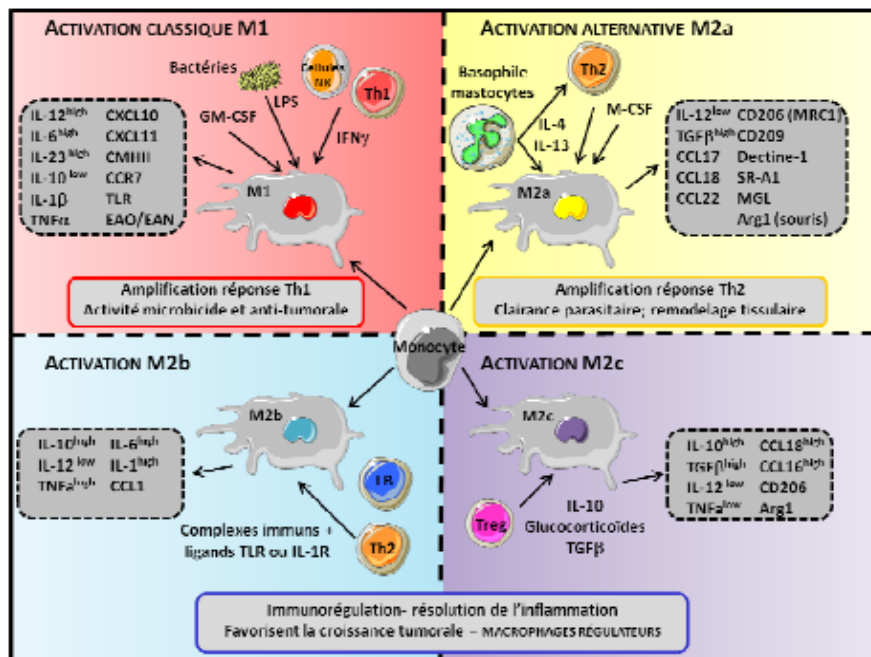


Figure 1.7. Les différentes formes d'activation des macrophages d'après (Martinez et al., 2008).

- **Macrophages classiquement activés (M1)**

Le terme classiquement activé a été utilisé pour désigner les macrophages effecteurs qui sont produits au cours des réponses immunitaires à médiation cellulaire. Ils sont caractérisés par une activation induite principalement par les cytokines de type Th1, essentiellement l'IFN- $\gamma$ , et d'autres cytokines et facteurs de croissance comme le GM-CSF et le TNF- $\alpha$ , ainsi qu'en réponse à un stimulus microbien, tel que le LPS (Huang et al., 2016; Mosser and Edwards, 2008). Cette population de macrophages a une activité microbicide, capacité tumoricide et stimule la réponse inflammatoire de type Th1 (Mosser and Edwards, 2008).

Ces macrophages sont aussi caractérisés par la forte expression d'IL-12 et IL-23, et les cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ , mais également des chimiokines, telles que CCL2, CCL5 (*Chemokine (C-C motif) ligand*), et CXCL8 (*Chemokine (C-X-C motif) ligand*), et le récepteur de chimiokine CCR7 (Benoit et al., 2008). Ces cellules expriment des molécules associées avec la présentation d'antigène comme HLA-DR et les molécules de co-stimulation (CD80/CD86) (**Figure 1.7**), mais une faible expression d'IL-10 (Huang et al., 2016).

Les macrophages M1 expriment aussi l'enzyme nitricoxidesynthase (iNOS) qui métabolise l'arginine en monoxyde d'azote (NO) et citrulline (Rath et al., 2014).

- **Macrophages alternativement activés (M2)**

Les macrophages alternativement activés est un nom générique utilisé pour diverses formes de macrophages non activés classiquement, résultant de l'exposition à l'IL-4 ou IL-13, IL-10, complexes immuns, ou glucocorticoïdes (**Figure 1.7**) (Huang et al., 2016).

Ces macrophages sont associés avec la réponse anti-inflammatoire Th2, la cicatrisation des blessures, la réparation des tissus, la résolution de l'inflammation et principalement dans les mécanismes d'immunorégulation (Mantovani et al., 2004a; Mosser and Edwards, 2008). Ils expriment un taux faible de cytokines inflammatoires comme l'IL-12 et un haut niveau de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ), des chimiokines CCL1, CCL13, CCL17, CCL18, CCL22 et CCL24 qui sont toutes impliquées dans le recrutement de différents types de cellules comme les lymphocytes T régulateurs (LT reg), les lymphocytes B, les basophiles et les éosinophiles (Mosser, 2003).

L'un des premiers signaux de l'immunité innée qui va être libéré lors de la lésion tissulaire est l'IL-4 qui est sécrété par les mastocytes et les basophiles. L'IL-4 stimule l'arginase du macrophage qui est une enzyme qui convertit l'arginine en ornithine et urée. L'ornithine est

un précurseur de polyamines et de la proline, qui sont importants pour la prolifération cellulaire et la réparation tissulaire (Mosser and Edwards, 2008; Rath et al., 2014).

Selon Mantovani et collaborateurs (2004), les macrophages M2 sont divisés en trois sous-types (**figure 1.7**). Les macrophages M2a activés par l'IL-4 et l'IL-13, les macrophages M2b activés par les complexes immuns associés aux agonistes des TLRs (*Toll-Like Receptor*) et les macrophages M2c principalement induits par les glucocorticoïdes, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  (Mantovani et al., 2004a). Les macrophages M2a sont qualifiés de macrophages « alternatifs et réparateurs » alors que les macrophages M2b et M2c sont qualifiés de macrophages « régulateurs et anti-inflammatoires » (Mosser and Edwards, 2008).

En résumé, suivant leur environnement et les signaux perçus, les macrophages peuvent acquérir des fonctions distinctes. Toutefois, la polarisation M1/M2 des macrophages ne représente pas deux populations distinctes mais un *continuum* d'état fonctionnel. En effet, plusieurs travaux ont montré qu'il existe une réversibilité de la polarisation M1/M2 des macrophages dérivés de monocytes murins (Redente et al., 2010; F. Xu et al., 2013). Ces observations suggèrent qu'au cours d'une infection, la réponse inflammatoire des macrophages débute par leur activation en phénotype M1 permettant l'élimination des pathogènes, puis s'orientent vers une polarisation de type M2 permettant de réguler la réponse inflammatoire et de favoriser la réparation tissulaire et le retour à l'homéostasie. Ces deux fonctions opposées d'une même entité révèlent à elles seules l'importante complexité et plasticité de la polarisation des macrophages, dont l'équilibre est nécessaire pour réguler la réponse inflammatoire.

### 1.2.5. Molécules de surface membranaire

Les molécules retrouvées à la surface des phagocytes peuvent varier en nature et en nombre selon le degré de différenciation du monocyte et du macrophage, du degré de leur activité ainsi que de leur type et de leur environnement. De plus, la liaison de ces molécules et de leurs substrats entraîne très souvent l'activation de la signalisation intracellulaire du monocyte/M $\phi$ . De cette première étape dépend également la coordination des réponses immunes innées et adaptatives afin d'obtenir la clairance du pathogène tout en limitant la réponse inflammatoire dans sa toxicité et les dommages tissulaires associés (**figure 1.8**).

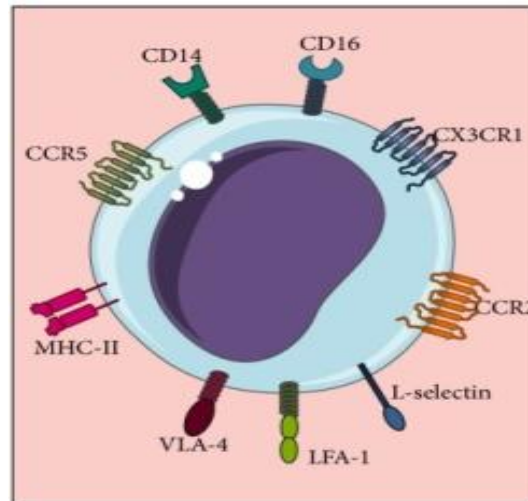


Figure 1.8. Récepteurs membranaires d'un monocyte classique (Rojas et al., 2015).

La reconnaissance entre la particule à ingérer et les récepteurs peut être de type « direct » par reconnaissance entre les motifs moléculaires des agents pathogènes appelés PAMPs et leurs récepteurs PRR (*pattern recognition receptors*) (Underhill, 2007).

Un autre groupe de reconnaissance par « opsonisation » est constitué de récepteurs de la portion constante (Fc) des immunoglobulines, appelés des récepteurs aux opsonines Fc $\gamma$ R. On retrouve principalement des récepteurs pour les IgG et les IgE appelés respectivement Fc $\gamma$ RIA, Fc $\gamma$ IIA, Fc $\gamma$ IIB, Fc $\gamma$ IIIA et Fc $\epsilon$ RIIb (Ravetch, 1997). Ces récepteurs sont responsables de l'attachement et de la phagocytose subséquente de particules recouvertes d'anticorps, dites opsonisées, tels que les microbes et les cellules tumorales (**figure 1.9**). Les récepteurs Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) et Fc $\gamma$ RIII (CD16) favorisant la clairance des pathogènes opsonisés par les IgG (Ambarus et al., 2012; Mantovani et al., 2004a). L'activation de ces récepteurs conduit majoritairement à une réponse pro-inflammatoire et à la production d'agents cytotoxiques permettant la destruction des agents pathogènes intracellulaires. Seul Fc $\gamma$ RIIB ne participe pas à la phagocytose. Il aurait plutôt un rôle inhibiteur à jouer dans la signalisation intracellulaire (Ravetch, 1994).

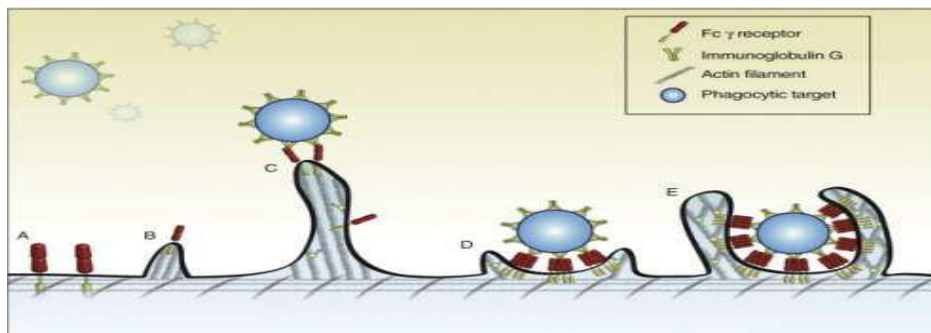


Figure 1.9. Modèle de liaison et d'internalisation des particules IgG-opsonisées par les récepteurs de type FcR (Jaumouillé and Grinstein, 2011).



Un groupe différent de récepteurs impliqués dans la phagocytose par le monocyte/M $\phi$  sont les récepteurs des molécules du complément : Le CR1 (*Complement Receptor 1*) (CD35), le CR3 (Mac-1, CD11b/CD18) et le CR4 (CD11c/CD18) (Carroll, 1998). Les particules recouvertes du complément (opsonisées) se fixent au monocyte/M $\phi$  via ces récepteurs.

Pour permettre leur adhésion aux cellules environnantes et à la matrice extracellulaire, les monocytes/M $\phi$ s possèdent des sélectines et des intégrines (regroupées de façon plus générale sous le terme adhésines). On retrouve des L-sélectines et des P-sélectines à la surface des monocytes/M $\phi$ . La liaison transitoire entre ces sélectines et leurs contre-récepteurs glucidiques permet le ralentissement des monocytes dans le vaisseau sanguin (Weis et al., 1998). Les intégrines LFA-1 (*lymphocytes function-associated antigen 1*) permettent la liaison ferme des monocytes/M $\phi$ s avec d'autres cellules et avec la matrice extracellulaire par exemple, lors de la présentation d'antigènes (Gahmberg et al., 1998).

Les monocytes/M $\phi$ s arborent également des récepteurs pour de nombreux facteurs de croissance (GM-CSF, M-CSF, CSF-1), de chimiokines (CC, CXC, CX3C,...) et de cytokines. Les facteurs de croissance permettent leur différenciation alors que les cytokines provoquent leur activation (McGee and Lewis, 1992) et les chimiokines favorisent le chimiotactisme de ces cellules vers le site de l'inflammation.

Les monocytes/M $\phi$ s expriment des récepteurs MRC1 qui sont des glycoprotéines de type lectines fortement induits en présence de cytokines Th2 (Martinez et al., 2008; Martinez-Pomares et al., 2003; Stein et al., 1992). Ils sont impliqués dans la reconnaissance et la phagocytose de certains pathogènes exprimant à leur surface des résidus oligosaccharides tels que le mannose et le fucose (Weis et al., 1998). L'activation de ces récepteurs induit un signal inhibiteur sur la réponse pro-inflammatoire *via* l'augmentation de l'expression du récepteur leurre à l'IL-1, la sécrétion de l'antagoniste à l'IL-1R (IL-1Ra) et la production d'IL-10 (Chieppa et al., 2003).

Le monocyte/M $\phi$  exprime également plusieurs membres de la famille Toll like receptors (TLRs) qui sont impliqués dans la réponse inflammatoire et cytotoxique du monocyte/M $\phi$  en provoquant l'induction du TNF- $\alpha$ , du NO et de l'IL-12 (Underhill and Ozinsky, 2002). Par ailleurs, le marqueur CD14 reconnu des monocytes, s'attache à leur membrane et a la capacité de lier les LPS bactériens des Gram négatifs *via* une protéine s'attachant au LPS (LPS-

*Binding Protein* (LBP) (Aderem and Ulevitch, 2000). Cette interaction mène à l'induction de l'activité pro-inflammatoire du monocyte (Wright et al., 1990).

### 1.2.6. Fonction et rôle des monocytes/macrophage

Les monocytes sont des éléments importants de la défense immunitaire car ces cellules peuvent phagocyter des matières étrangères, présenter des Ag à la cellule T et produire des cytokines telles que le TNF, l'IL-1- $\beta$  et l'IL-6. L'expression des cytokines par les monocytes est efficacement déclenchée par la stimulation avec des produits bactériens comme les LPS (Nockher and Scherberich, 1998).

Les monocytes/macrophages jouent de nombreux rôles clés tant dans la réponse immunitaire innée qu'adaptative et sont considérés comme les principaux acteurs de l'inflammation. Pour cela, ils doivent d'abord être activés. Cette activation peut être causée par les différents médiateurs de l'inflammation présents avant l'arrivée des monocytes circulants ou affectant les M $\phi$ s résidents. En effet, l'induction de la réponse inflammatoire en cas de dommages tissulaires ou d'infection favorise l'expression de molécules d'adhésion qui peuvent activer la différenciation des cellules recrutées (Mahalingam and Karupiah, 1999).

#### 1.2.6.1. Rôle dans la réponse innée

##### 1.2.6.1.1. Production d'agents microbicides

- **Métabolites de l'oxygène**

Les cellules phagocytaires activées (monocytes/macrophages) produisent un certain nombre d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) tel que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), comme moyen de défense très important (Wang et al., 2013). En effet, ce sont des oxydants très puissants impliqués dans la destruction des pathogènes (Potter et al., 2005). L'inflammation est une source importante de radicaux oxygénés produits directement par ces cellules phagocytaires activées qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative qui consiste en l'activation du complexe NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) oxydase. Cette enzyme utilise l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes ( $O_2^-$ ) au niveau de la membrane cellulaire, en transférant un électron d'une molécule de NADPH à l'oxygène ( $O_2$ ) lorsque la cellule métabolise une grande quantité de glucose et augmente sa consommation en  $O_2$ . Le superoxyde peut ensuite produire des oxydants très puissants tels les radicaux hydroxyl ( $OH^-$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) dans le phagosome ou dans l'espace extracellulaire.

L' $H_2O_2$  est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers (Fialkow et al., 2007). Il est relativement toxique pour les cellules et est

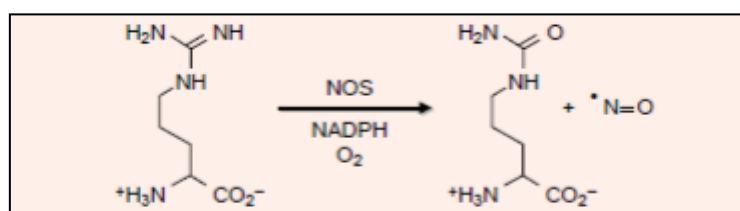
utilisés par l'organisme dans de nombreuses voies de signalisation et comme médiateurs régulant des fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, la migration, et la mort cellulaire programmée selon sa concentration (Afonso et al., 2007; Halliwell and Gutteridge, 2015; Rabinovitch and Suarez-Pinzon, 1998; Veal et al., 2007).

Dans certaines conditions pathologiques, ces ROS sont produits de façon excessive. L' $\text{H}_2\text{O}_2$  peut oxyder directement les composés biologiques notamment les protéines. Cela va entraîner une modification de la structure de la protéine et altérer sa fonction (Bretón-Romero and Lamas, 2014). De plus, il a été récemment montré que le  $\text{H}_2\text{O}_2$  induit la production du NO en augmentant l'expression de l'iNOS induite par le LPS (Lijia et al., 2012).

Par ailleurs, la concentration du  $\text{H}_2\text{O}_2$  est régulée par des enzymes telles que la catalase présente dans les peroxysomes (Gardès-Albert et al., 2003).

- **Monoxyde d'azote (NO)**

Le NO est une molécule extrêmement importante du système immunitaire à plusieurs niveaux, dont les fonctions passent de fonctions physiologiques à des mécanismes pathophysiologiques (Ducrocq et al., 2001). Il joue également un rôle dans la neurotransmission, la relaxation musculaire et la vasodilatation (MacMicking et al., 1997). Les monocytes, sont capables de produire du NO à partir de l'oxydation de la L-arginine, dans une réaction catalysée par des systèmes enzymatiques très complexes, finement régulés appelés NO-synthases (NOS) (Förstermann and Sessa, 2012; Vannini et al., 2015). Au cours de la réaction enzymatique (**figure 1.10**), dans laquelle la L-arginine est utilisée comme substrat, l'enzyme utilise du NADPH et de l' $\text{O}_2$  comme cofacteurs.



**Figure 1.10. Réaction de formation du monoxyde d'azote catalysée par les NO synthases (Vadon-Le Goff and Sennequier, 1998).**

Trois isoformes de NO synthases ont été isolées jusqu'à présent : NO synthase neuronale (nNOS et NOSI) ; NO synthase inductible (iNOS et NOSII) et NO synthase endothéliale (eNOS ou NOSIII) (Mattila and Thomas, 2014; Vannini et al., 2015). La NOS-II est inductible, en réponse à des stimuli inflammatoires, générant une grande quantité de NO (Haviarová et al., 2011), alors que NOS-I et NOS-III sont constitutives et produisent un faible taux de NO (Alderton et al., 2001).

Les cytokines interviennent comme inducteur, inhibiteur ou régulateur de la production du NO. Les cytokines proinflammatoires INF- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  sont les plus importants inducteurs de la transcription de la NOS-II (Drapier, 1997). Ces deux cytokines peuvent aussi être combinées aux LPS et à l'IL-1 $\beta$  pour engendrer un effet maximal (Nussler et al., 1993). D'autres cytokines agissent sur la régulation négative de la production du NO (Bogdan and Nathan, 1993; James, 1995). Ainsi, le TGF- $\beta$ , l'IL-4 et l'IL-10 modulent directement la production du NO soit en induisant l'arginase (une enzyme en compétition avec iNOS pour la L-arginine), ou en inhibant l'expression de la NOS-II au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (James, 1995; Liew et al., 1991).

L'activation des monocytes/macrophages par les cytokines ou chimiokines, provoque l'expression de la NOS-II qui est généralement le résultat de la réponse inflammatoire chronique localisée ou diffuse, suite à une infection ou à une altération tissulaire. L'iNOS métabolise l'arginine en monoxyde d'azote (NO) et citrulline. Le NO peut être métabolisé en d'autres espèces réactives de l'azote en aval, tandis que la citrulline pourrait être réutilisée pour la synthèse de NO efficace *via* le cycle citrulline (Rath et al., 2014). Le NO produit, joue par conséquent un rôle important dans la régulation, l'initiation et le développement des mécanismes de défense immunitaire de l'hôte (Dugas et al., 1998; Moncada et al., 1991) par son action cytostatique et cytotoxique (Moncada, 1992; Sherman et al., 1991; Stuehr and Marletta, 1985). Le NO peut aussi avoir des effets dommageables sur les cellules et tissus sains (Bogdan, 2001) et peut favoriser le développement de plusieurs maladies comme certaines formes d'inflammations chroniques et auto-immunes.

Dans certains cas, la production de NO a des effets bénéfiques (Thiemermann et al., 1995). En effet, le NO est doté d'importantes propriétés immunorégulatrices, autocrine ou paracrine régulant notamment la balance Th1/Th2 par l'inhibition de la prolifération des LT, interférant ainsi avec les mécanismes de défense cellulaire et exerçant un effet immunosuppresseur (Jianjun Yang et al., 2013; Vannini et al., 2015). Il peut également causer l'apoptose des lymphocytes T (Allione et al., 1999), diminuer l'expression des molécules du CMH classe II et des molécules de costimulation (Bogdan, 2001) et diminuer l'expression de différentes adhésines (Lefer et al., 1999; Spiecker et al., 1998). Il peut finalement, en modulant la signalisation intracellulaire, faire augmenter ou diminuer l'expression de plusieurs cytokines et ainsi modeler la réponse immunitaire (Baker et al., 2009; Bogdan, 2001).

### 1.2.6.1.2. Phagocytose

La phagocytose est le moyen utilisé par les cellules pour ingérer des particules pathogènes. La majorité des cellules de l'organisme ont une certaine capacité de phagocytose. Cependant, certaines cellules sont spécialisées dans ce domaine comme les monocytes/M $\phi$ s, les neutrophiles et les cellules dendritiques immatures (Aderem and Underhill, 1999).

Le monocyte/M $\phi$  peut phagocyter toutes sortes de particules telles que les micro-organismes, les débris cellulaires et les cellules sénescents et tumorales, grâce aux récepteurs reconnaissant des motifs conservés à la surface des pathogènes. Ces récepteurs sont appelés PRR (Medzhitov and Janeway, 1997). On retrouve dans cette catégorie le récepteur de mannose (MR) (de la famille des lectines), certaines intégrines tel que le CR3 (Complement Receptor), les récepteurs Scavenger et le CD14 (Sasry and Ezekowitz, 1993; Stahl and Ezekowitz, 1998).

La particule à phagocyter peut également être recouverte de molécules du complément qui sont reconnues par leurs récepteurs sur le monocytes/M $\phi$  (Carroll, 1998). L'organisme peut également être recouvert d'IgG et être reconnu par les récepteurs de la portion Fc des immunoglobulines (Fc $\gamma$ R). Il s'en suit alors une polymérisation de la F-actine en réponse à la transduction de signaux induite par l'attachement aux récepteurs (Ravetch, 1997). On observe alors le rapprochement de plusieurs récepteurs FcR qui favorisent l'internalisation ou l'invagination de la membrane plasmique (Aderem and Underhill, 1999) et entraînent la production de cytokines pro-inflammatoires (Brown et Gordon, 2002).

Une fois le phagosome complètement formé, il y a dépolymérisation de la F-actine. Le phagosome est alors accessible aux endosomes précoces qui peuvent s'y lier. La maturation du phagosome en phagolysosome est une suite de fusion avec des endosomes précoces puis tardifs et finalement avec les lysosomes. Le lysosome contient différentes enzymes lytiques de même que des ROI (*reactive oxygen intermediates*) dont les métabolites du NO permettront la dégradation de la particule ingérée (Aderem and Underhill, 1999; Desjardins et al., 1994). La dernière étape du processus de phagocytose est l'apprêtement des peptides pour la présentation des antigènes à la surface des phagocytes (Niedergang and Chavrier, 2004).

### 1.2.6.1.3. Activation cellulaire et chimiotactisme

En plus de reconnaître et de permettre l'élimination des pathogènes par la phagocytose et la sécrétion de produits microbicides, les monocytes/M $\phi$ s sont extrêmement importants dans l'orchestration de la réponse immunitaire. Pour ce faire, les monocytes/M $\phi$ s sécrètent des cytokines, chimiokines et d'autres médiateurs de l'inflammation qui favorisent l'attraction des

leucocytes aux sites lésés, et entraînent leur activation de même que leur production dans la moelle osseuse (Schindler and Darnell, 1995). La production de chimiokines et de cytokines est intimement liée à la différenciation et au type d'activation des monocytes et des macrophages ainsi qu'à la polarisation de la réponse immune dans son ensemble.

- **Cytokines et facteurs de croissance**

Les cytokines sont de petites protéines solubles qui permettent aux différentes cellules de communiquer entre elles. Ces cytokines exercent leur action lorsqu'elles se fixent à leur récepteur spécifique à la surface des cellules. Ceci engendre l'activation d'une cascade de signalisation intracellulaire qui affecte la fonction de la cellule (Arango Duque and Descoteaux, 2014; Schindler and Darnell, 1995).

Tout d'abord, le monocyte/M $\phi$  stimulé, sécrète une grande variété de cytokines dites pro-inflammatoires, l'IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ , l'IL-6, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ . L'IL-1 et l'IL-6 favorisent l'activation des lymphocytes T et B et l'activation des cellules NK (*Natural Killer*) de façon synergique (**figure 1.11**) (Janeway, 2001). Le TNF- $\alpha$  permet l'activation autocrine des monocytes/M $\phi$ , en augmentant, entre autres, le stress oxydatif, la cytotoxicité et la phagocytose (Aggarwal and Natarajan, 1996).

Le monocytes/M $\phi$  synthétise aussi l'IL-12 qui active les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et induit les cellules NK à sécréter de l'IFN- $\gamma$  qui est une cytokine très importante dans l'activation des M $\phi$ s. L'IL-12 provoque aussi la polarisation de ces lymphocytes T vers un phénotype Th1 (Brunda, 1994).

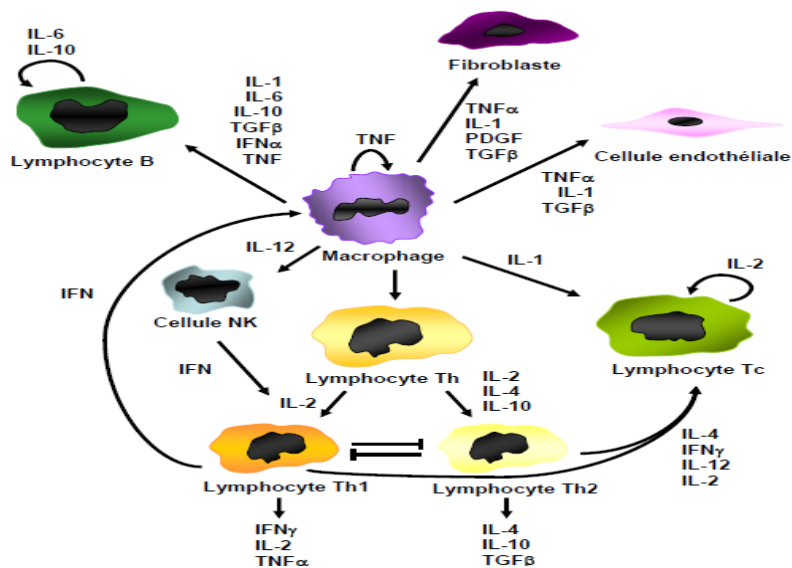


Figure 1.11. Le réseau des cytokines (Andre, 2008).

À l'opposé, les monocytes/macrophages alternatifs produisent de l'IL-10 qui inhibe l'activation des Mφs pro-inflammatoire et la prolifération des lymphocytes T (en inhibant la production d'IL-1, -6, -12 et de TNF- $\alpha$ ) et qui stimule la prolifération des lymphocytes B et leur sécrétion d'immunoglobulines en inhibant l'expression des molécules de CMH-II des macrophages activés, mais aussi la prolifération des lymphocytes T (Chadban et al., 1998). Le monocyte/Mφ sécrète de l'IFN- $\alpha$  (ou de type 1) qui a une action autocrine antivirale et qui favorise la production de molécules de CMH de classe I. Il produit aussi le TGF- $\beta$  qui favorise la prolifération des fibroblastes et la guérison tissulaire mais inhibe la division des lymphocytes T et B (Brown et Gordon, 2002).

Finalement, les monocytes/Mφs produisent plusieurs facteurs de croissance comme M-CSF, G-CSF, GM-CSF, qui permettent la prolifération des précurseurs hématopoïétiques des monocytes et des granulocytes de la moelle osseuse.

- **Chimiokines**

Les chimiokines sont une famille spéciale de cytokines avec des propriétés chemoattractantes. Elles induisent le recrutement cellulaire et fournissent des signaux essentiels pour la différenciation de la cellule. Dans la réponse inflammatoire, une grande variété de cellules impliquées dans l'immunité innée et adaptative libère des chimiokines (Comerford and McColl, 2011). Elles sont classées généralement en quatre catégories selon la position et le nombre de leurs cystéines conservées (CC, CXC, CX3C, C). Généralement, les chimiokines de la famille CC sont responsables du recrutement des monocytes/Mφs, lymphocytes, basophiles et éosinophiles alors que les chimiokines de la famille CXC recrutent davantage les neutrophiles. La classe C contient la lymphotactine qui agit sur les différents lymphocytes. Enfin, la classe CX3C recrute les monocytes et les lymphocytes T (Mahalingam and Karupiah, 1999). Les monocytes/Mφs modifient profondément leur panel de production de chimiokines en réponse à la polarisation des LT (Mantovani et al., 2004b). De plus, les chimiokines permettent le recrutement sélectif de lymphocytes T et de cellules effectrices impliquées spécifiquement dans les réponses immunes de type Th1 ou de type Th2. Ces cellules présentent des répertoires de récepteurs aux chimiokines distincts. Un phénotype Th1 correspond à l'expression des récepteurs de type CXCR3 et CCR5. A l'opposé, CC, CCR3, CCR4, CCR8 sont préférentiellement exprimés par les Th2 (Andalib et al., 2011). Ces chimiokines sont secrétées essentiellement par les monocytes/macrophages et les cellules stromales (Bonicchi et al., 1998; Mantovani et al., 2004a; Sallusto et al., 1998).

#### **1.2.6.1.4. Synthèse des protéines du complément**

Les monocytes/M $\phi$ s activés produisent aussi des fractions C1, C2 et C3 du complément qui favorisent l'inflammation et aident dans l'élimination des pathogènes (Vincent et al., 1993).

#### **1.2.6.1.5. Apoptose**

Les monocytes/M $\phi$ s participent également à l'homéostasie cellulaire en détruisant et phagocytant les cellules apoptotiques et les composés toxiques (Franc et al., 1996). L'apoptose est crucial dans le développement et l'homéostasie de tous les organismes multicellulaires. Les caractéristiques typiques des cellules apoptotiques sont la fragmentation nucléaire, bourgeonnement de la membrane et la présentation des signaux « mange- moi ». L'intégrité de la membrane est préservée, et les cellules sont soigneusement englouties par les cellules voisines et les phagocytes professionnels (Teo, 2003).

#### **1.2.6.1.6. Activation de l'arginase**

L'Arginase (Arg) est une enzyme qui hydrolyse la L-arginine en ornithine et urée, précurseurs des polyamines (spermines et spermidine) (Durante et al., 2007). Chez les mammifères, il existe deux isoenzymes d'arginase: l'arginase I et II. Ces deux isoformes diffèrent par leurs propriétés fonctionnelles, leurs localisations tissulaires et cellulaires ainsi que par la nature des mécanismes régulant leur expression (Munder, 2009). L'arginase I est une enzyme cytosolique, exprimée principalement dans le foie en tant qu'élément du cycle d'urée (Michell et al., 2011), tandis que l'arginase II est une protéine mitochondriale trouvée dans une série de tissus périphériques, comme dans le rein, la prostate, le petit intestin et la glande mammaire d'allaitement (Munder et al., 2005).

Chez l'Homme, l'arginase a été détectée dans les cellules mononucléaires du sang périphériques (PBMC) après une blessure (Ochoa et al., 2001). Elle est induite aussi dans les cellules myéloïdes principalement par les cytokines Th2 et participe à une variété de maladies inflammatoires par la régulation négative de la synthèse d'oxyde nitrique, l'induction de la fibrose et la régénération tissulaire (Maarsingh et al., 2009).

Les produits d'hydrolyse de l'arginine entraîneraient une augmentation de la production d'urée et la L-ornithine, qui conduit à l'augmentation des polyamines, la proline, et le glutamate (impliqué dans la croissance et la prolifération cellulaire), ainsi que la réduction des NO (Michell et al., 2011). De ce fait, la compartimentation intracellulaire des arginases peut avoir des implications importantes dans le métabolisme de l'arginine. Par exemple, de par sa colocalisation avec l'ornithine décarboxylase dans le cytoplasme, l'arginase I va préférentiellement diriger l'ornithine vers la synthèse de polyamines, médiateurs nécessaires à



la synthèse de la matrice extracellulaire qui contrôlent l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la croissance cellulaire et qui jouent aussi un rôle très important dans les phénomènes de réparation tissulaire (Hobbs and Gilmour, 2000). L'arginase II, de par sa colocalisation avec l'ornithine aminotransférase dans la mitochondrie va plutôt diriger l'ornithine vers la synthèse de proline (précurseur du collagène) et de glutamate (Li et al., 2001) essentiels dans la prolifération tissulaire et la synthèse de collagène (Satriano, 2004; Shearer et al., 1997).

Par ailleurs, l'oxyde nitrique (NO) est également synthétisé à partir de la L-arginine par l'oxyde nitrique synthase (NOS). Cette synthèse est régulée par l'arginase. En effet, une diminution de l'activité de l'arginase conduit à une augmentation de la disponibilité de l'arginine et provoque une augmentation de la production de NO (Munder, 2009). Tandis qu'une plus grande activité de l'arginase va diminuer la production de NO (Munder, 2009). Ainsi, lors de l'activation des monocytes/macrophages, l'activité arginase entraîne une diminution de L-arginine disponible pour la NOS inductible et entraîne ainsi une diminution de la réponse cytotoxique de ces cellules (Hey et al., 1997).

### **1.2.6.2. Rôle dans la réponse adaptative**

#### **1.2.6.2.1. Cellules présentatrices d'antigènes**

En plus d'être très importants dans l'élimination immédiate des pathogènes, les monocytes/M $\phi$ s ont un rôle primordial à jouer dans l'établissement d'une réponse immunitaire spécifique médiée par les LT, dite adaptative, en tant que cellule présentatrice d'antigènes aux lymphocytes T (Brown et Gordon, 2002). La présentation de l'antigène se réalise grâce au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le CMH de classe I est exprimé chez presque toutes les cellules nucléées de l'organisme. Il est responsable de la présentation de peptides cytosoliques, endogènes, issus ou non de la digestion de pathogènes (Mantegazza et al., 2013). Le CMH de classe II est spécifique aux cellules présentatrices d'antigènes, comme les monocytes/M $\phi$ s, les cellules dendritiques et les lymphocytes B, et est impliqué dans la présentation des antigènes exogènes résultant de la phagocytose (Mantegazza et al., 2013). Les cellules présentatrices d'antigènes migrent ensuite aux ganglions lymphatiques drainants afin d'activer les LT (Lindahl et al., 1997).

Les molécules du CMH de classe I et de classe II présentes à la membrane des monocytes/macrophages sont exposées aux lymphocytes T pour induire leur activation (Lindahl et al., 1997; Mantegazza et al., 2013). Les macrophages M1 favorisent la présentation des antigènes aux lymphocytes T *via* une augmentation de l'expression des CMH

de classe I et de classe II et les molécules de co-stimulation (CD80, CD86) (Ambarus et al., 2012; Mantovani et al., 2004a; Martinez et al., 2008). Les macrophages M2a et M2b expriment également les CMH de classe II et les molécules de co-stimulation (CD80, CD86) (Mosser, 2003; Mosser and Edwards, 2008). En revanche, la présentation des antigènes est réduite dans les macrophages M2c *via* une diminution de l'expression des CMH de classe II et des molécules de co-stimulation (Martinez et al., 2008; Schebesch et al., 1997).

#### 1.2.6.2.2. Activation des lymphocytes T

Dans le ganglion lymphatique, les monocytes/macrophages (en tant que CPA) entrent en contact avec les lymphocytes T naïfs au niveau du cortex. La reconnaissance de l'antigène nécessite l'interaction de plusieurs molécules de surface. Pour le premier signal, le complexe TCR-CD3 du LT reconnaît l'antigène et la molécule de CMH de la CPA. Cette liaison, est renforcée par des molécules co-réceptrices. Ce sont les glycoprotéines membranaires CD4 et CD8 qui s'unissent au CMH et stabilisent le complexe TCR-CMH (Robey and Allison, 1995). Le deuxième signal est produit par les molécules de costimulation CD28 chez le lymphocyte qui s'associe à B7.1 et B7.2 sur la CPA. Ces deux signaux induisent l'expansion clonale du LT naïf qui est médiée par l'augmentation de la production d'IL-2 et par la synthèse de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2. L'IL-2 induit par la suite la division active du LT de façon autocrine (Robey and Allison, 1995).

Certains LT ont comme corécepteur le CD8 alors que d'autres ont le CD4. Le CD8 se lie à la molécule de CMH classe I. Ces cellules sont appelées cytotoxiques car elles provoquent la lyse des cellules infectées par des organismes cytosoliques en reconnaissant l'antigène localisé dans la niche peptidique du CMH-I. Les LT CD4<sup>+</sup> ne se lient qu'aux cellules exprimant le CMH-II, soit les CPA. Ces lymphocytes peuvent se différencier en plusieurs sous-populations selon le patron de cytokines qu'ils expriment. Les deux sous-populations les plus connues sont la Th1 et la Th2 (Mosmann et Fowell, 2002).

#### 1.2.7. Monocytes/Macrophages et DT1

L'immunité innée joue un rôle primitif dans le développement du DT1 (Aribi, 2011). Les CPA en particulier les monocytes/M $\phi$ s sont les premières cellules à infiltrer les îlots pancréatiques (Jansen et al., 1994; Yoon and Jun, 2005) et sont impliquées dans la destruction des cellules  $\beta$  du pancréas (Turley et al., 2003). Par ailleurs, plusieurs études montrent que les monocytes/M $\phi$ s jouent un rôle dans la pathogenèse du diabète de type 1 par deux voies d'activation, classique et alternative (Bradshaw et al., 2009; Martin et al., 2008; Yang, 2008).

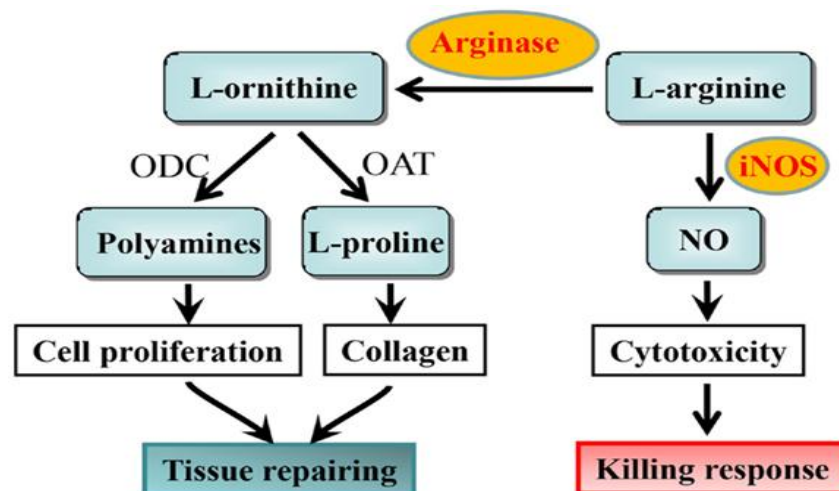
Les monocytes/macrophages activés classiquement déclenchent une réponse inflammatoire puisque elles sont les premières cellules professionnelles impliquées dans le processus phagocytaire des microorganismes utilisant plusieurs mécanismes qui initient une insulite et la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques au cours du diabète de type 1 (Aribi et al., 2015). Ils jouent un rôle clé dans le développement d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire, notamment dans l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (Yoon and Jun, 2005). Leur rôle dans la pathogénèse du DT1 peut être également dus à leur activité cytotoxique à l'égard des cellules  $\beta$  pancréatiques (Dahlén et al., 1998; Turley et al., 2003). Dans le cas du DT1, ces monocytes/macrophages réagissent à des agents pathogènes intracellulaires en sécrétant des cytokines proinflammatoires tels que les interleukines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 et IL-23), le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  pour stimuler les réponses immunitaires adaptatives (Luo et al., 2010). Cette dernière cytokine incite les monocytes/macrophages à sécréter de grandes quantités de TNF et d'IL-1 $\beta$ . Ce dernier provoque l'apoptose des cellules  $\beta$  qui expriment le récepteur de l'IL-1 $\beta$  (Lehuen et al., 2010). L'INF- $\gamma$  augmente également l'expression des chimiokines tel que CXCL9 et CXCL10 par les cellules  $\beta$  qui servent de facteurs chimiotactiques pour les cellules T cytotoxiques (Kaminitz et al., 2007). Ils expriment aussi des molécules de co-stimulation (CMH, CD40 et CD86) importantes à l'activation des LT, et produisent des médiateurs toxiques tels que l'oxyde nitrique (NO) par l'expression de l'iNOS et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent induire l'apoptose et la nécrose des cellules  $\beta$  (Espinoza-Jiménez et al., 2012; Szablewski, 2014). De plus, l'IL-12 favorise la différenciation des cellules Th1 causant une inflammation qui déclenche une insulite.

Les monocytes/macrophages peuvent détruire la cellule  $\beta$  du pancréas et induire l'apoptose après interaction Fas (CD95) exprimé par les cellules  $\beta$  et Fas-L exprimés par les lymphocytes T (Kaminitz et al., 2007).

Les monocytes/macrophages activés alternativement sont induits pendant la réponse Th2 lors de l'infection et des réactions allergiques, après une stimulation avec l'IL-4/l'IL-13 (Stein et al., 1992) par l'intermédiaire du récepteur d'IL-4R et du signal transducteur et activateur du facteur de transcription 6 (STAT6) (Martinez et al., 2008; Sica and Mantovani, 2012; Tugal et al., 2013). De plus, chez le DT1, ces monocytes/macrophages diminuent l'insulite ainsi que l'inflammation générée au niveau du pancréas en réduisant l'atteinte des cellules  $\beta$  (Szablewski, 2014). Ils renforcent également l'action de l'insuline dans les adipocytes par la sécrétion de l'IL-10 (Wynn et al., 2013). Ces données suggèrent que ces cellules peuvent avoir des rôles importants dans l'inhibition et la prévention du DT1.

### 1.2.8. Arginase/monoxyde d'azote et monocytes/macrophages activés

Le monocyte joue un rôle majeur dans le système immunitaire, à la fois en tant que cellule effectrice antimicrobienne et comme cellule immuno-régulatrice qui induit, supprime ou module la réponse immunitaire adaptative. Le métabolisme de l'arginine est essentiel à l'orientation phénotypique du monocyte/M $\phi$  (Isidro and Appleyard, 2016; Rath et al., 2014). La principale source de NO produite par les monocytes/M $\phi$ s classiques est la forme inductible de l'oxyde nitrique (iNOS, NOSII). Cette enzyme métabolise la L-arginine en NO et citrulline (**Figure 1.12**). En outre, lors d'une réponse immunitaire à médiation humorale, les LB secrètent l'IL-4 et l'IL-13 qui stimulent l'enzyme arginase des monocytes alternatifs. Cette enzyme métabolise la conversion de L-arginine en ornithine et urée. L'ornithine entre dans la synthèse de proline et de polyamine qui interviennent dans la prolifération cellulaire et la réparation tissulaire (Rath et al., 2014).



**Figure 1.12. Métabolisme de l'arginine par iNOS et arginase et les conséquences fonctionnelles sur les monocytes/macrophages (Yang and Ming, 2014).**

ODC: ornithine decarboxylase  
OAT: ornithine aminotransferase

L'arginase métabolise donc la L-arginine dans deux voies métaboliques différentes. En effet, arginase et NOS sont en compétition et peuvent dès lors réguler négativement l'activité de l'autre. Il pourrait donc exister une régulation croisée de ces deux systèmes enzymatiques métabolisant l'arginine. Ainsi, au niveau du monocyte/macrophage classique, en réponse au stimuli microbien et au cytokines de type Th1 (Cenci et al., 1993), l'expression de iNOS est contrôlée par la disponibilité de l'arginine parce qu'au cours de la synthèse de NO il y a la production du NOHA (N<sup>G</sup>-hydroxy-L-arginine) qui inhibe les deux isoformes de l'arginase, favorisant la polarisation du macrophage vers un profil M1 (Ochoa et al., 2001; Rath et al., 2014; Rutschman et al., 2001). Tandis que, dans les monocytes/M $\phi$ s alternatifs, l'expression de iNOS et la production de NO sont limitées par la déplétion arginine suite à sa conversion

par l'arginase induite par les cytokines de type Th2 que sont l'IL-4, l'IL13 et le TGF- $\beta$  (Bogdan and Nathan, 1993; El-Gayar et al., 2003; Mosser and Edwards, 2008; Munder, 2009; Ochoa et al., 2001; Rath et al., 2014). De même, l'activité des NOS peut être inhibée par les polyamines produits par les arginases (Szabó et al., 1994). Grâce à différents mécanismes, les monocytes/macrophages alternatifs sont donc en mesure d'inhiber la réponse inflammatoire et de favoriser la réparation tissulaire subséquente.

### 1.3. Le Rituximab (anti CD20)

#### 1.3.1. Définition du Rituximab

Le Rituximab est un anticorps monoclonal (immunoglobuline de type G), dirigé spécifiquement contre la molécule CD20, présente à la surface des cellules B, du stade pré-B au stade de lymphocyte B mature (Quint, 2004). Il s'agit d'un anticorps chimérique composé de deux parties, d'une part, un domaine d'origine murine au niveau des régions variables (Fab) des chaînes légères et lourdes. C'est cette partie qui se lie spécifiquement à l'Ag CD20 des cellules B et pré-B, en gardant ses propriétés immunogènes afin de permettre l'activation du système immunitaire. D'autre part, un domaine d'origine humaine au niveau des régions constantes (Fc) (chaîne lourde  $\gamma$  1 et chaîne légère kappa) (**figure 1.13**). Celui-ci permet au Rituximab d'agir en synergie avec les mécanismes effecteurs du système immunitaire humain (Cartron et al., 2004) par l'interaction avec l'extrémité Fc (Kahn and Gisselbrecht, 2014).

Le Rituximab altère la fonction des LB et réduit leur capacité de communication avec les LT, prévenant ainsi la prolifération des LB et la production d'autoanticorps (Catroux et al., 2017).

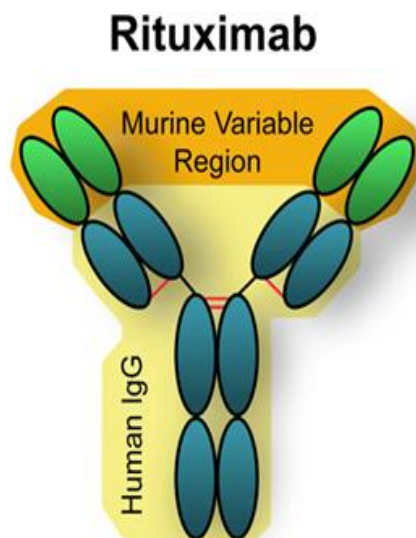


Figure 1.13. Le Rituximab (Pierpont et al., 2018).

### 1.3.2. Molécule CD20

Le CD20 est le premier antigène (Ag) de différenciation des lymphocytes B humains à avoir été identifié à l'aide d'anticorps monoclonaux. C'est un marqueur précoce spécifique des cellules B au cours de leur développement du stade pré-B au stade lymphocyte B mature. Il est néanmoins absent de la surface des plasmocytes (Reff et al., 1994). Le gène codant est localisé sur le bras long du chromosome 11 (11q12-q13). Le CD20 est une phosphoprotéine transmembranaire de 297 acides aminés (35 kd) non glycosylée, possédant 4 domaines transmembranaires, deux extrémités N et C terminales intracellulaires et un domaine extracellulaire de taille réduite. La portion cytoplasmique comporte de nombreux sites de phosphorylation (Tedder and Engel, 1994).

La fonction du CD20 reste encore mal définie. Il est probablement impliqué dans la régulation des flux calciques à travers la membrane cytoplasmique des cellules B (Tedder and Engel, 1994). Il intervient dans la transduction du signal au cours de l'activation et de la différenciation du lymphocyte B. La molécule CD20 pourrait représenter un canal calcique, être liée à un transporteur calcique ou réguler la fonction d'un tel transporteur (Tedder and Engel, 1994). Le CD20 pourrait intervenir dans la régulation de la prolifération de la cellule B en modulant la concentration cytoplasmique du calcium. En effet, ces variations de concentration déterminent le passage d'un cycle cellulaire à un autre tel que le passage de la phase G0 à G1 (augmentation de la concentration cytoplasmique du calcium) ou de la phase G1 à S (diminution de la concentration cytoplasmique du calcium) (Bubien et al., 1993).

### 1.3.3. Mode d'action du Rituximab

Les fonctions mêmes de la cible (CD20) du Rituximab étant partiellement connues, les modes d'actions de cet anticorps sont également mal élucidés. Cependant, le Rituximab pourrait induire la déplétion lymphocytaire B par trois mécanismes principaux: lyse par le complément, cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante et induction d'apoptose (**Figure 1.14**):

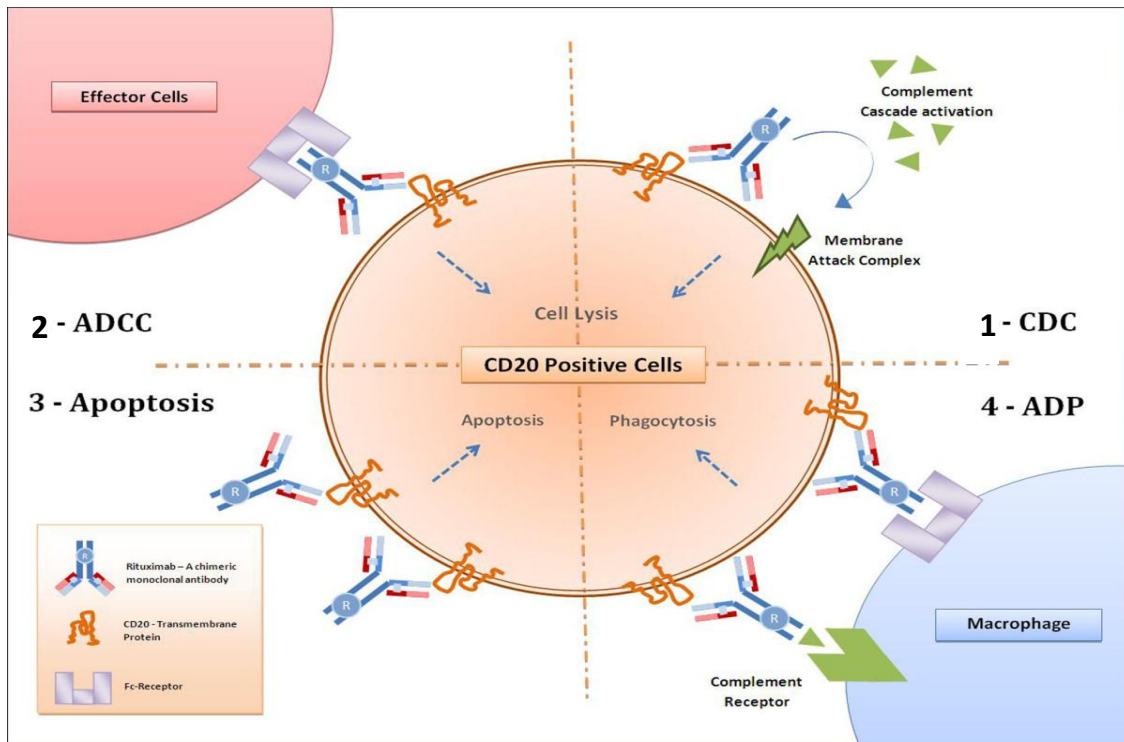


Figure 1.14. Mécanismes d'action du Rituximab (Kasi et al., 2012).

ADP : antibody-dependent phagocytosis

### 1.3.3.1. Une cytotoxicité médiée par le complément (CDC)

La fixation du Rituximab à sa cible antigénique (le CD20) entraîne la formation d'un complexe immun et conduit à sa redistribution au sein de rafts lipidiques de la membrane cytoplasmique (Cragg and Glennie, 2004). Cette redistribution augmente la fixation de la protéine du complément C1q à la portion Fc ( $\gamma 1$ ) du Rituximab du fait d'une grande concentration de complexes antigène-anticorps et/ou d'une orientation favorable du fragment Fc du Rituximab (Golay et al., 2001). Par la suite, le C1q activé va déclencher une cascade lytique entraînant la destruction des cellules cibles par les différentes fractions du complément (Cragg and Glennie, 2004; Smith, 2003) (**figure 1.15**). En plus de la lyse finale par le complexe d'attaque membranaire (MAC), l'activation du complément entraîne le dépôt de C3, C3b et des protéines de dégradation du C3b à la surface des cellules. Ces fragments attachés à la membrane pourraient constituer des cibles pour les cellules effectrices portant le récepteur C3, augmentant ainsi la mort cellulaire par ADCC (Cartron et al., 2004).

Les effets de la CDC sont caractérisés par un gonflement des mitochondries, une dilatation du réticulum endoplasmique rugueux, des altérations du complexe de Golgi et de la membrane plasmique et nucléaire, et la disparition de l'hétérochromatine conduisant à la production d'espèces réactives de l'oxygène (Bellosillo et al., 2001).

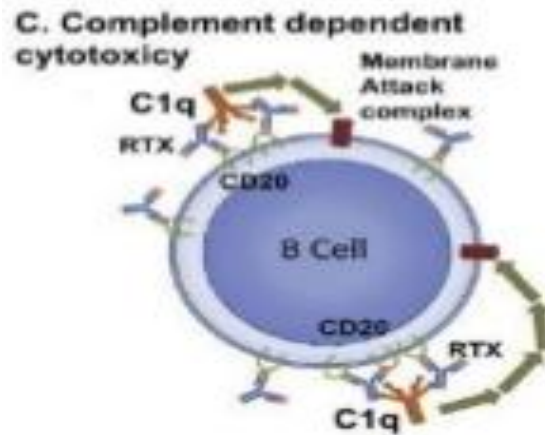


Figure 1.15. Cytotoxicité médiée par le complément (Reis et al., 2018).

### 1.3.3.2. Une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)

L'ADCC est un mécanisme impliquant la liaison de la portion Fc de l'anticorps au récepteur (FcγR) exprimé à la surface des cellules immunitaires effectrices cytotoxiques telles que les monocytes, les macrophages, les cellules NK et les granulocytes (Cartron et al., 2004; Manches et al., 2003; Smith, 2003) (figure 1.16).

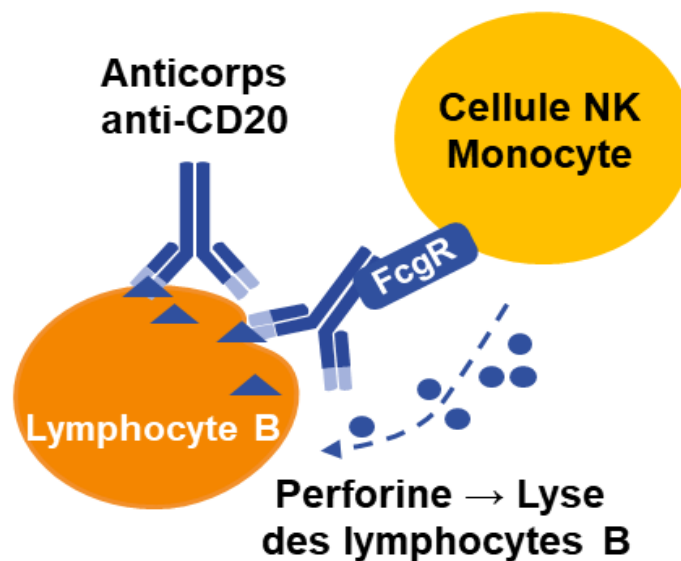


Figure 1.16. Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps d'après (Smith, 2003).

Les cellules effectrices agissent, après liaison de la portion Fc de l'IgG du Rituximab sur leur récepteur spécifique FcγR, contre les cellules sur lesquelles sont liés les Ac afin de les détruire. Il existe trois types de récepteurs : FcγRI ou CD64, FcγRII ou CD32 et FcγRIII ou CD16. Ils comprennent des récepteurs activateurs tels que FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIc et FcγRIIIa qui portent un motif ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) contenant une tyrosine. Ce motif est phosphorylé lors de la liaison à l'anticorps ou complexe



immun. Il s'ensuit soit une phagocytose, une exocytose de granules toxiques, l'ADCC ou la synthèse de cytokines (Cartron et al., 2004; Manches et al., 2003; Smith, 2003). Il existe également des récepteurs inhibiteurs tels que FcγRIIb qui contiennent des motifs ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*). Ils n'entraînent pas de mort ou de lyse cellulaire mais engendrent l'activation de la cellule B. Selon une étude menée par Clynes et ses collaborateurs en 2000, des souris déficientes en récepteur inhibiteur FcγRIIb seraient hypersensibles au mécanisme d'ADCC tandis que des souris déficientes en récepteurs activateurs FcγRI et FcγRIIIa seraient incapables d'arrêter la croissance tumorale *in vivo*. Ces résultats démontrent que l'ADCC est dépendante des récepteurs FcγR et que pour atteindre une efficacité optimale l'anticorps doit se lier de préférence aux récepteurs activateurs (Clynes et al., 2000). Ce mécanisme nécessite donc le recrutement de cellules effectrices de type monocytes et l'interaction de récepteur FcγR présent à la surface de ces cellules.

L'existence d'un polymorphisme au sein des récepteurs FcγR (notamment le récepteur FcγRIIIa), présent sur les monocytes, expliquerait au moins en partie la variabilité de la déplétion lymphocytaire B au cours des lymphomes et des maladies auto-immunes (Cragg and Glennie, 2004). En effet, un dimorphisme phénylalanine (F) ou valine (V) en position 158 du récepteur FcγRIIIa modifie son affinité aux IgG1 et son pouvoir d'activation des cellules effectrices. Il semble que l'allotype 158 V possède une plus forte affinité pour l'IgG1 humaine que l'allotype F et augmente ainsi l'ADCC. Le génotype homozygote FCGR3A-158 V apporte de loin une meilleure réponse au Rituximab que l'homozygote 158-F ou l'hétérozygote (Anolik et al., 2003). Ainsi, l'efficacité anti-tumorale du Rituximab serait plus marquée en présence d'un FcγRIIIa de haute affinité (Cartron et al., 2002; Farag et al., 2004; Hatjiharissi et al., 2007; Koene et al., 1997).

Par ailleurs, Il existe un lien entre le mécanisme d'ADCC et la CDC. En effet, les molécules provenant de l'activation de la cascade du complément telles que C3b, iC3b, C4b, viennent se fixer sur la cellule cible. Les cellules effectrices qui possèdent des récepteurs pour les fractions du complément vont alors lyser ces cellules cibles. Ces cellules tueuses impliquées sont les cellules NK (récepteur CD11c/CD18) et les monocytes/Mφs (récepteur CD11b/CD18). Ce mécanisme connu sous le nom de CDCC (Complement-Dependent Cellular Cytotoxicity) est aussi favorisé par des anaphylatoxines telles que le C5a, C3a et C4a qui jouent un rôle important dans l'inflammation et dans la défense de l'hôte. Ces anaphylatoxines conduisent à la libération d'histamines et de leucotriènes. Ainsi, la CDCC pourrait être un mécanisme effecteur mais il est souvent ignoré ou inclus dans l'ADCC (van Meerten et al., 2006; Zhou et al., 2008).

### 1.3.3.3. Un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose des cellules B

La fixation du Rituximab sur sa cible CD20 induit un changement de conformation de la molécule CD20 par le biais d'une phosphorylation. Il s'ensuit une augmentation du flux calcique vers le secteur intracellulaire et donc une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium qui activerait directement les caspases conduisant ainsi à l'apoptose (Byrd et al., 2002; Sibilina and Sordet, 2005; Stolz et al., 2008). En effet, l'augmentation du calcium intracellulaire aurait comme conséquence le blocage du cycle cellulaire en phase S (Riley and Sliwkowski, 2000). Les anticorps anti-CD20 inhibent la progression cellulaire de la phase G1 à la phase S/G2+M car la progression du cycle cellulaire est dépendante de la basse concentration du calcium cytosolique. Cette activité sur les flux de calcium conduit à l'apoptose. Il est possible que le CD20, de par sa configuration ancrée dans la membrane, joue le rôle de canal calcique générant ainsi un flux de calcium nécessaire à l'apoptose après liaison à l'anticorps anti-CD20 (Shan et al., 1998). Une étude menée par Shan et ses collègues a démontré que la liaison de l'anticorps anti-CD20 à l'antigène CD20, déclenche l'activation de différentes voies de signalisation dont certaines entraîneraient des effets proapoptiques dus aux protéines tyrosine kinase qui favorisent la libération de  $Ca^{2+}$  depuis le réticulum endoplasmique et d'autres conduiraient à des effets antiapoptiques (Shan et al., 2000, 1998).

Dans l'ensemble, les mécanismes d'action du Rituximab sont complexes et partiellement élucidés avec des résultats contradictoires selon les études. De même, il demeure incertain de savoir lequel de ces mécanismes est le plus important dans l'activité du Rituximab. Néanmoins, ces différents mécanismes ne sont pas forcément exclusifs.

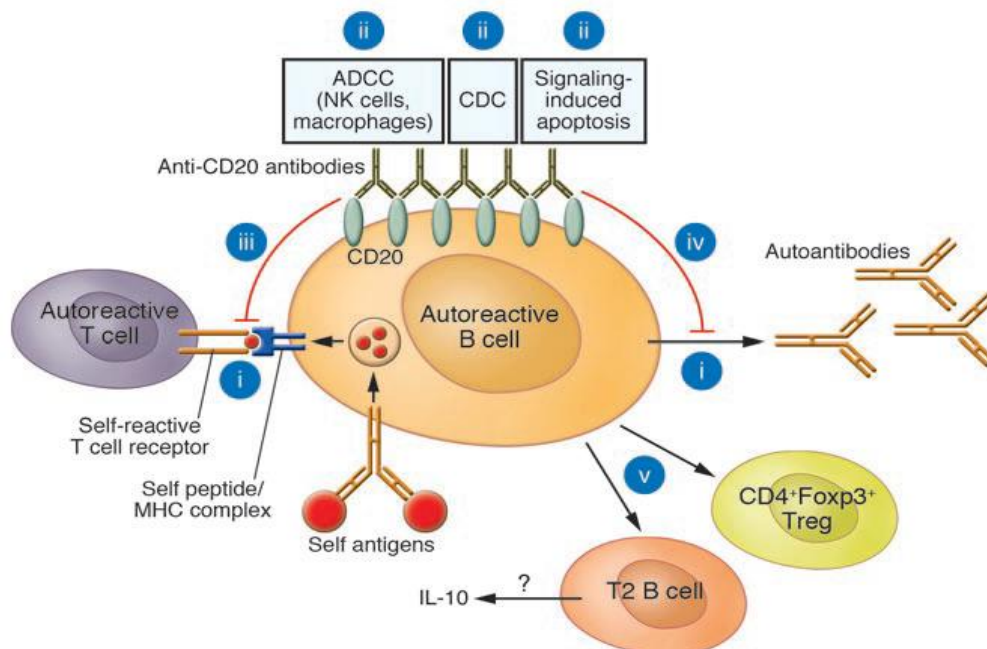
### 1.3.4. Anticorps anti-CD20 ciblant les lymphocytes B et DT1

S'il est établi que l'auto-immunité observée dans le diabète de type 1 est principalement médiée par les lymphocytes T, il apparaît que les lymphocytes B pourraient également jouer un rôle dans le développement de la maladie. En effet, plusieurs études récentes chez des souris NOD, ont montré que plus de 50% des lymphocytes infiltrant les îlots de Langerhans (insulite), au stade initial de la maladie, sont des cellules B (Brodie et al., 2008; Green and Flavell, 1999) et que ces cellules B sont absolument nécessaires au développement du diabète (Serreze et al., 1996; Serreze and Silveira, 2002). En effet, les souris NOD déficientes en cellules B matures ne développent pas de DT1 (Mariño et al., 2009; Noorchashm et al., 1997). En absence de cellules B, les souris NOD ont montré des nombres significativement plus faibles de cellules T  $CD4^+$  et  $CD8^+$  dans leurs lésions insulitiques (Brodie et al., 2008; Hu et

al., 2007; Wong et al., 2004; Xiu et al., 2008), suggérant un rôle important des cellules B dans l'activation des lymphocytes T autoréactifs.

Le rôle de ces lymphocytes dans la physiopathologie du diabète de type 1 n'est pas encore bien établi, mais diverses hypothèses ont été émises. Les lymphocytes B «auto-réactifs» peuvent jouer un rôle *via* la production d'auto-anticorps, mais il semble bien que ceux-ci sont davantage des marqueurs d'auto-immunité que des facteurs cytotoxiques proprement dits. Plus probablement, les lymphocytes B interviendraient davantage en présentant les auto-antigènes aux cellules T et seraient ainsi un maillon essentiel dans le processus conduisant à la réaction auto-immune (Bour-Jordan and Bluestone, 2007; Falcone et al., 1998; Serreze et al., 1998). Elles sont également une source de production d'une vaste gamme de cytokines, telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, la lymphotoxine, l'IL-6 et l'IL-10, qui peuvent réguler le développement, l'expansion ou la différenciation des cellules Th1 et Th2, ainsi que la production d'anticorps (Bosly, 2006).

Le Rituximab serait capable d'induire une certaine déplétion de ces LB. Ce phénomène permet alors de réduire le nombre de cellules capables de présenter les auto-antigènes aux cellules T auto-réactives (**figure 1.17**). Une influence favorable sur les phénomènes d'auto-immunité peut ainsi être étudiée et divers résultats encourageants ont été décrits dans différentes pathologies (Bour-Jordan and Bluestone, 2007; Liossis and Sfikakis, 2008).



**Figure 1.17. Traitement anti-CD20 et cellules B en auto-immunité (Bour-Jordan and Bluestone, 2007).**

Concernant le DT1, il a été montré chez la souris NOD (transgénique dans cette étude pour exprimer l'antigène CD20 humain sur les lymphocytes B) qu'un traitement par le Rituximab, à un stade précoce de la maladie, induisait une déplétion des LB capable d'offrir une protection contre l'apparition d'un diabète auto-immun (Hu et al., 2007). De plus, l'efficacité du traitement par le Rituximab chez les diabétiques de type 1, dans les 3 mois qui suivent le diagnostic, a été démontrée dans un essai clinique mené par TrialNet, intitulé «Les effets du Rituximab sur la progression du diabète de type 1 chez les sujets d'atteinte récente» (Pescovitz et al., 2009).

## 1.4. Problématique et objectifs

### 1.4.1. Problématique

Le diabète de type 1 est une maladie polygénique et multifactorielle impliquant autant de facteurs environnementaux que de facteurs génétiques. De plus, le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune qui résulte de la destruction progressive et sélective des cellules  $\beta$  pancréatiques productrices de l'insuline par les lymphocytes T autoréactifs. Ces derniers sont activés par un mécanisme en cascade d'activité des cellules de l'immunité innée en particulier le monocyte/macrophage qui possède une activité cytotoxique naturelle.

Il a été démontré que suite à leur activation, les monocytes avaient un profil inflammatoire qui joue un rôle important dans le processus autodestructif des cellules  $\beta$  pancréatiques. Alors que les monocytes alternatifs participent à la réparation tissulaire par la production de cytokines anti-inflammatoires et l'activation de l'enzyme Arginase. Par ailleurs, différentes stratégies d'immunothérapie basées sur l'utilisation des Ac monoclonaux ont récemment été envisagées. Le Rituximab (Anti-CD20) est un anticorps monoclonal chimérique anti-CD20, de plus en plus utilisé comme traitement dans les affections auto-immunes. Son mode d'action peut conduire à la destruction cellulaire par un certain nombre de mécanismes indépendants effectués *via* des cellules effectrices telles que les monocytes en activant le récepteur Fc $\gamma$ R. Dans cette optique, nous avons évalué l'effet de l'anti CD20 sur la polarisation des monocytes au cours du diabète de type 1 d'atteinte récente.

### 1.4.2. Objectifs

Contribuer à l'étude *ex vivo* de l'effet du Rituximab sur la polarisation des monocytes au cours du diabète de type 1 par l'analyse des balances : production du NO/activité de l'arginase et cytokines inflammatoires/cytokines anti inflammatoires ainsi que l'évaluation du niveau d'activation des monocytes isolés à partir du sang périphérique d'enfants diabétiques de type 1 d'atteinte récente.

### 1.4.3. But

Montrer que le Rituximab pourrait, d'une part, avoir un effet immunomodulateur sur l'activité inflammatoire du monocyte, sa capacité phagocytaire et son action de lyse intracellulaire, et d'autre part, induire sa polarisation vers un état d'activation alternatif anti-inflammatoire.

## Chapitre 2

Le traitement au rituximab module la libération du peroxyde d'hydrogène et la production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes au début du diabète de type 1.

**“Rituximab treatment modulates the release of hydrogen peroxide and the production of proinflammatory cytokines by monocyte at the onset of type 1 diabetes”.**

2.1. Matériels et méthodes

2.2. Résultats

2.3. Discussion

## RESEARCH ARTICLE

# Rituximab Treatment Modulates the Release of Hydrogen Peroxide and the Production of Proinflammatory Cytokines by Monocyte at the Onset of Type 1 Diabetes

Linda Hamouda, Maroua Miliani, Zeyneb Hadjij, Rabia Messali and Mourad Aribi\*

Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria

**Abstract: Background:** Monocytes are the main blood innate mononuclear phagocyte and one of the most important effector cells expressing Fc $\gamma$  receptor, which is critical for the interaction with Fc domain of antibodies.

**Objective:** To evaluate the effect of Rituximab (RTX, a chimeric human anti-CD20 monoclonal antibody) on the functional activities of Monocytes (MOs) at the onset of human Type 1 Diabetes (T1D).

**Methods:** MOs were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from volunteer patients with recent-onset T1D and healthy control donors.

**Results:** The levels of the production of Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-6 were significantly increased in MOs from patients with T1D when compared to MOs from healthy controls (respectively,  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ ). Similarly, Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), and intracellular free Calcium Ion ( $_{i}Ca^{2+}$ ) levels were increased in T1D MOs than in control MOs, but the difference did not reach a significant level. Conversely, the production levels of IL-4 and catalase activity, as well as of both phagocytosis and killing capacities were decreased in MOs of T1D patients compared to MOs from healthy controls, but the difference was not significant for catalase activity and killing capacity (respectively,  $p < 0.01$ ,  $p > 0.05$ ,  $p < 0.01$ , and  $p > 0.05$ ). Additionally, treatment with RTX significantly upregulated phagocytosis ( $p < 0.05$ ), markedly downregulated the release of IL-1 $\beta$  ( $p < 0.01$ ),  $_{i}Ca^{2+}$ , hydrogen peroxide (H $_2$ O $_2$ ), and slightly downregulated the Nitric Oxide Synthase (NOS) activity, NOS activity-to-arginase activity ratio, the levels of Lactate Dehydrogenase (LDH)-based cytotoxicity, and the production of IL-6 and IFN- $\gamma$ . Moreover, RTX treatment significantly upregulated the production of IL-4 ( $p < 0.05$ ), IL-10 ( $p < 0.01$ ) and the catalase activity ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Our study has shown for the first time that RTX can reverse the abnormal functional activities of MOs as well as their production of proinflammatory cytokines at the onset of T1D. From a therapeutic point of view, RTX may potentially be suggested at the beginning of T1D to immunomodulate innate immunity and inflammatory conditions.

**Keywords:** Functional activities of monocyte, phagocytosis and killing capacities, proinflammatory and anti-inflammatory/regulatory cytokines, respiratory burst, rituximab, type 1 diabetes.

## 1. INTRODUCTION

T1D is a chronic, slow and progressive autoimmune disease, resulting from selective destruction of insulin-producing pancreatic  $\beta$ -cells [1]. The immunopathogenesis of T1D is typically associated with the activation of autoreactive T cells. Other mononuclear cells are also involved in  $\beta$ -cells destruction, including MO and macrophage cells [2].

MOs can infiltrate pancreatic islets and participate in the disease as proinflammatory cells [3, 4]. Of note, classically

activated MOs, associated with T helper type 1 (Th1) activity, trigger an inflammatory response and induce death of  $\beta$ -cells using several mechanisms [4], including the increase of respiratory/oxidative burst, and the release of proinflammatory cytokines, like IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$ , and IL-6.

IL-1 $\beta$  has been shown to inhibit *in vitro* insulin secretion by Langerhans islet cells, and induces their destruction [5], as well as participates in proinflammatory process at the beginning of T1D [6]. IFN- $\gamma$  exerts its function mainly at the level of MOs and in the activation of autoreactive CD8 $^+$  T cells, which accelerates the destruction of  $\beta$ -cells by the release of perforin and cytotoxic mediators (granzymes) [7]. IL-6 is involved in the proinflammatory response and essentially produced by MOs [8].

\*Address correspondence to this author at the Department of Biology, University of Tlemcen, and Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, PO Box: 262, Imama-Mansourah, Rocade # 2, 13000 Tlemcen, Algeria; E-mail: [m\\_aribi@mail.univ-tlemcen.dz](mailto:m_aribi@mail.univ-tlemcen.dz)

Alternatively activated MOs have been shown to be associated with T helper type 2 (Th2) anti-inflammatory responses, wound healing and inflammation resolution. They can be induced by glucocorticoids and anti-inflammatory cytokines, such as IL-4 and IL-10 [9].

Of great interest, RTX is increasingly used as a therapeutic way for T1D, targeting B-cells function as Antigen-Presenting Cell (APC) and Autoantibody-Producing Cell (AbPC) that induce autoimmune destruction of  $\beta$ -cells what will trigger inflammatory process of the disease [10]. Its mode of action can lead to cell destruction by a number of independent mechanisms: when monoclonal antibodies (mAbs) bind to the surface of the cell, they can cause necrosis or apoptosis or inhibit cell growth [11-13], through several signaling pathways, depending on the epitope or receptor target. These mechanisms include Complement-Dependent Cytotoxicity (CDC), Ab-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) and/or phagocytosis [11]. They are mediated *via* effectors cells, like MOs, by activating Fragment crystallizable  $\gamma$  Receptors (Fc $\gamma$ R) [14]. These receptors bind the most common class of antibodies, IgG, and are involved in the subsequent phagocytosis of opsonized cells or particles [15]. Interestingly, we do not know yet if RTX administration would have an effect on other cells of immunity in the circulation, like MO cells. In this context, we tried to check if RTX can immunomodulate functional activities of MOs and their production of both proinflammatory and anti-inflammatory cytokines at the recent-onset T1D.

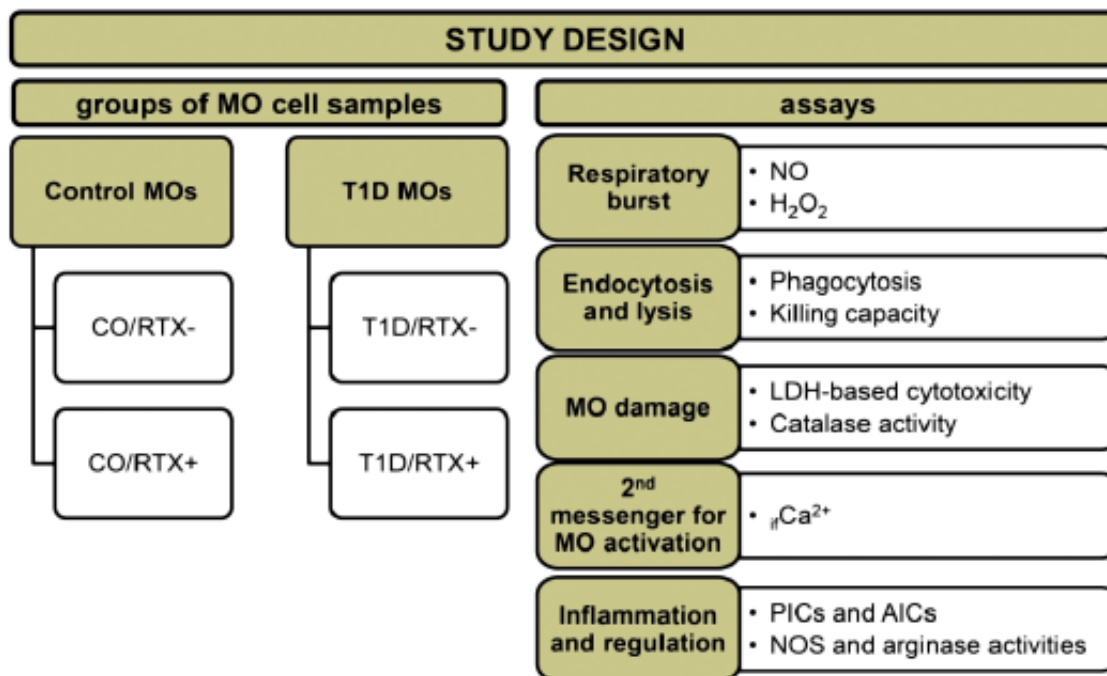
## 2. MATERIALS AND METHOD

### 2.1. Study Design

We studied the effect of RTX on MOs isolated from PBMCs collected from whole peripheral blood of two types of volunteers, including six human T1D patients and six age- and sex-matched healthy control donors (Co), supplemented (RTX+) or not (critical controls) with RTX (RTX-). Patients and controls (4 male and 2 female, <16 years old in each group) were all Caucasian children and belong to the same geographical locality (northwest of Algeria). The main exclusion criteria were the association with other autoimmune disorders, infection, inflammation, and any other factors that might interfere with the inflammatory process. Among the main inclusion criteria were patients with recent-onset T1D (diabetes duration <6 months). The effects of RTX on the levels of MOs Nitric Oxide (NO) production, NOS activity, the release of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, as well as LDH-based cytotoxicity were examined in MOs supernatant cultures. RTX effect on the levels of  ${}_{i}Ca^{2+}$ , arginase activity, catalase assays as well as on  $H_2O_2$  production was evaluated on cell lysates. Phagocytosis and killing capacities were performed on a mixture of MOs, *Staphylococcus aureus* and RTX. All experiments were repeated independently at least three times. The study design is summarized in Fig. (1).

### 2.2. Cell Samples and Culture of PBMCs

Blood samples were collected into ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-containing Vacutainer tubes (BD,



**Fig. (1).** Study design. This study was conducted in four (groups) of cell samples, including MOs isolated from PBMCs collected from whole peripheral blood of volunteers with recent-onset human T1D patients (T1D) or healthy control donors (Co), supplemented (RTX+) or not (critical controls) with RTX (RTX-). AICs: anti-inflammatory cytokines, CO/RTX-: monocytes from healthy controls untreated with RTX, CO/RTX+: monocytes from healthy controls treated with RTX, T1D/RTX-: T1D monocytes untreated with RTX, T1D/RTX+: T1D monocytes treated with RTX,  $H_2O_2$ : hydrogen peroxide,  ${}_{i}Ca^{2+}$ : intracellular free calcium ions, LDH: lactate dehydrogenase, MO: monocyte, NO: nitric oxide, NOS: nitric oxide synthase, T1D: type 1 diabetes, PICs: proinflammatory cytokines, RTX: rituximab.



Belliver Industrial Estate, UK). PBMCs were purified from blood samples on a Ficoll gradient (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA). After washing twice with phosphate-buffered saline (PBS), PBMCs were suspended in RPMI-1640. Viability was assessed using Trypan Blue Exclusion Test (TBET) [16].

### 2.3. Isolation of MOs and *Ex Vivo* Treatment with RTX

MOs were freshly isolated from PBMCs by plastic adherence procedure [17]. In brief,  $10^6$  cells/mL of PBMCs suspensions are seeded in flasks or 24-well cell culture plates, then cultured in RPMI-1640 medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and  $40\mu\text{g/mL}$  gentamycin, in 5%  $\text{CO}_2$  humidified incubator at  $37^\circ\text{C}$  to allow MOs adherence. Non-adherent cells were removed, and the adherent MOs were stimulated by  $100\text{ng/mL}$  lipopolysaccharides (LPS) [18], and incubated for 18h at  $37^\circ\text{C}$  in a humid atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  in the presence or absence of RTX at a dose of  $0.1\mu\text{g}/10^5$  cells/mL [19, 20]. After incubation, cell-free supernatants were collected and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . The cell viability was performed using TBET. Both MOs isolation and stimulation by LPS were systematically followed by the assessment of CD14, for cell purity checking, and CD16/Fc $\gamma$ RIIIa cell surface expression. After fixation by 4% paraformaldehyde for 15 minutes and blocking by 5% FBS in PBS for 1 h, MOs were stained with PE anti-human CD14 antibody and FITC anti-human CD16 antibody from BD Pharmingen. The positive cells were assessed using inverted cell imaging fluorescence microscopy station (Fluor Cell Imaging Station, Thermo Fisher Scientific, MA USA), and counted with ImageJ software (the National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) [21, 22]. The purity of the monocytes was around 90%, and the expression levels of CD16 were 12-15% in control MOs and 16-40% in T1D MOs.

### 2.4. Cell Lysis Assay

For catalase,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  production and arginase activity assays, cells were lysed as described [23]. Briefly, cells were treated for 30 min with 0.1% Triton X 100. Reaction was stopped by the addition of a mixture containing Tris-HCl and  $\text{MnCl}_2$ .

### 2.5. Oxidative Burst Assay

Respiratory burst assay was established by the studying of the levels of NO production and  $\text{H}_2\text{O}_2$  [24].

#### 2.5.1. NO Assay and NOS Activity

The levels of NO were determined after 18 h of incubation by measuring the physiologically stable oxidative metabolite (NOx, nitrite and nitrate) accumulation by a Griess sensitive colorimetric reaction, using Trichloroacetic Acid (TCA), vanadium III chloride ( $\text{VCl}_3$ ) and Griess reagent as described [25]. Absorbance was spectrophotometrically determined at 540nm on the ELISA plate reader (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK). The concentration of NO was determined from linear standard curve established by

0-150 $\mu\text{mol/L}$  sodium nitrite. NO concentrations allowed us to estimate NOS activity. NOS activity was estimated by normalizing each NO concentration to milligrams of protein and expressed as picomoles/mg proteins/30 min.

#### 2.5.2. $\text{H}_2\text{O}_2$ Assay

Levels of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in cell lysates were measured by spectrophotometer using a commercial kit (Abcam, Cambridge, MA, USA), according to manufacturer's instructions.

### 2.6. Arginase Activity Assay

The activity of arginase was measured using a spectrophotometric method based on the determination of the level of urea and total proteins production, after the addition of L-arginine, as described [26]. The total protein assay was carried by using a commercial Kit (Total Protein, BioSystems, Barcelona, Spain). The absorbance of the standard and the sample was read off against the blank at 545 nm. After activation by heating at  $56^\circ\text{C}$  for 10 min, a volume of activated lysate was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 1 h with the equal volume of arginine solution (0.5M). Finally, 1 volume 96%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 3 volumes 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 7 volumes distilled water was added to stop the reaction. The concentration of the urea generated after arginine catabolism by arginase was determined at 600 nm using a commercial kit (UREA/BUN-COLOR, BioSystems, S.A. Costa Brava 30, Barcelona, Spain). The arginase activity was expressed as nanomoles urea/mg proteins/1 h.

### 2.7. $\text{Ca}^{2+}$ Assay

$\text{Ca}^{2+}$  levels were assayed with the orthocresolphthalein (OCP) complexone method [27], using a commercial kit (BioSystems S.A. Costa Brava 30, Barcelona, Spain). The technique was based on the formation of a chromogenic complex resulting from the reaction of calcium with OCP complexone in alkaline solution, which yields a violet colored complex. Absorbance of the free calcium ions content were spectrophotometry measured at 560nm against a blank. The levels of  $\text{Ca}^{2+}$  were expressed as  $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteins.

### 2.8. Cytokine Assays

Levels of IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10 and IFN- $\gamma$  were measured by a quantitative sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using respective commercial kits, according to the manufacturer's instructions (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA). Optical densities (OD) were measured at 450nm with an ELISA plate reader (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK).

### 2.9. Phagocytosis and Killing Capacity Assays

Phagocytosis and pathogen killing assays were carried out using *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 strain (American Type Culture Collection), as described in detail [24]. The Phagocytosis results were determined using the percentage decrease in the number of extracellular bacteria. The percentage of intracellular pathogen killing was determined after the MO viability assay using TBET.

## 2.10. Cytotoxicity Assay

LDH-based cytotoxicity assay was spectrophotometrically performed on ELISA reader at 450nm to evaluate the levels of cytotoxicity in MO supernatants by using a sensitive MAK066 commercial kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103, USA). The measurement of LDH activity released from the cytosol of damaged cells into the supernatant was based on the reduction of NAD substrate to NADH. LDH activity was expressed as nmole/min/mL.

## 2.11. Catalase Activity Assay

Catalase activity assay was carried out spectrophotometrically by measuring the decrease in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration at 410 nm using Aebi's method. At time zero, each lysate (250µg/mL) was mixed with a phosphate buffer containing 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. One milliliter of the mixture was immediately added to a disposable cuvette and placed into a spectrophotometer. Measurement of absorbance was taken 5 min after addition of the lysate to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> buffer. One unit of catalase activity corresponds to the amount of enzyme catalyzing the conversion of 1µmole H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed/min/mg proteins [28].

## 2.12. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed with IBM SPSS Statistics software version 20.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All data were described as the means ±

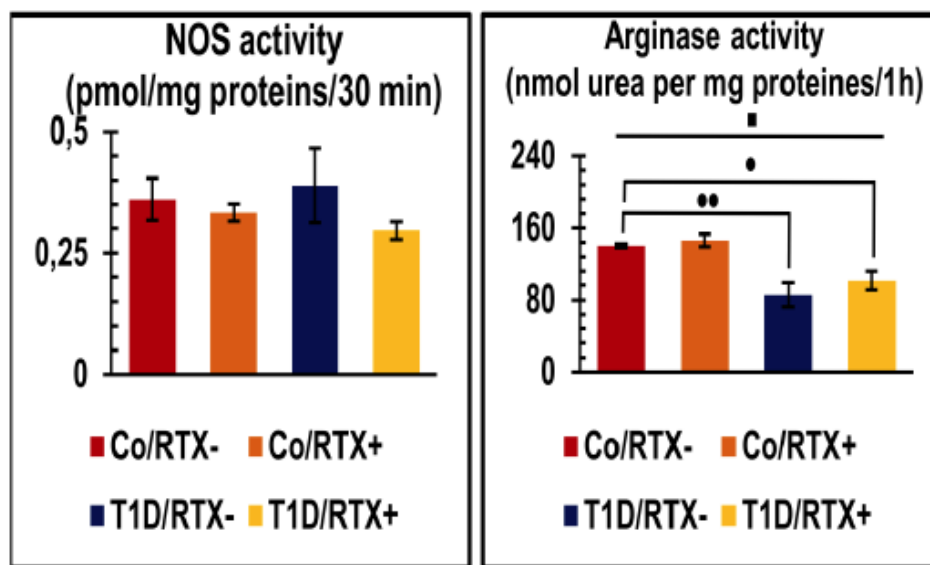
Standard Error of Mean (SEM). Differences in mean values between groups were performed by Kruskal-Wallis test for comparison of four groups or two-tailed Mann-Whitney *U* test for comparison of two groups, as the data were not normally distributed [29]. *P*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

## 3. RESULTS

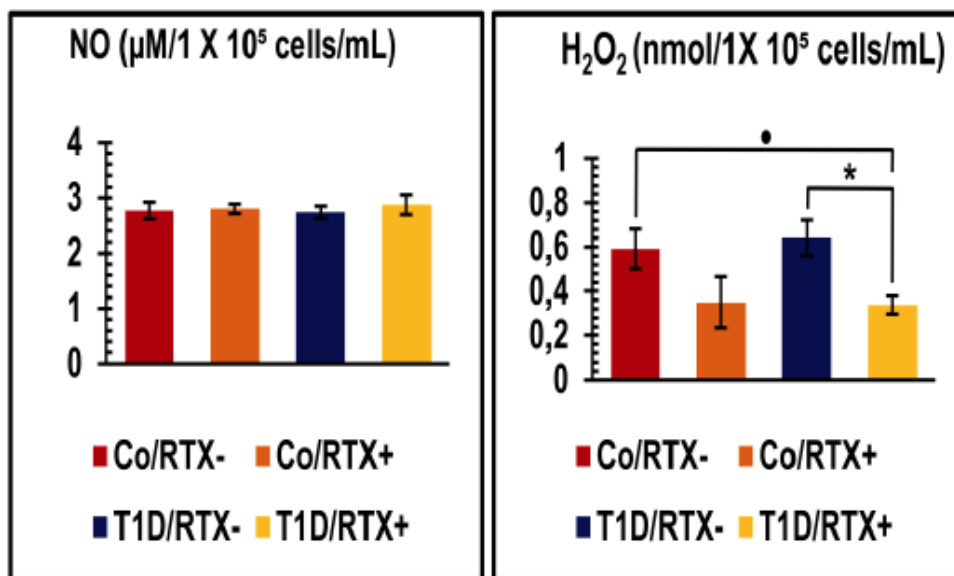
In this study, we tried to investigate the *ex vivo* effect of RTX on the immunomodulation of functional MO activities and their proinflammatory cytokines release at the onset of T1D.

### 3.1. RTX has a Weak Effect on NOS and Arginase Activities

As depicted in Fig. (2), there are no significant differences in NOS activity between T1D MOs and healthy control MOs; while arginase activity was significantly decreased in T1D MOs (respectively,  $p > 0.05$  and  $p < 0.01$  by Mann-Whitney *U* test). Additionally, RTX treatment slightly down-regulated the NOS activity and upregulated arginase activity in T1D MOs compared to MOs from healthy controls, but the differences did not reach statistical significance when comparing RTX-untreated T1D MOs and RTX-treated T1D MOs (for both comparisons,  $p > 0.05$  by Mann-Whitney *U* test). For all comparisons, *p*-value was greater than 0.05 for NOS activity and less than 0.05 for arginase activity by Kruskal-Wallis test.



**Fig. (2).** Effect of RTX on NOS and arginase activities in T1D MOs. NOS activity was obtained by normalizing each NO concentration to milligrams of protein. Arginase activity levels were spectrophotometrically determined by measurement the concentration of urea after the addition of L-arginine. The results are presented as the mean ± standard error of mean (SEM). MO: monocyte, NOS: nitric oxide synthase, CO/RTX-: monocytes from healthy controls untreated with RTX, CO/RTX+: monocytes from healthy controls treated with RTX, T1D/RTX-: T1D monocytes untreated with RTX, T1D/RTX+: T1D monocytes treated with RTX, T1D: type 1 diabetes, RTX: rituximab. Comparisons between all groups using Kruskal-Wallis test are presented with a black square: \* $p < 0.05$ . Significant differences highlighted by single comparisons with RTX-untreated control monocytes using Mann-Whitney *U* test are highlighted with a black dot: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . For NOS activity, *p*- values were greater than 0.05 using both Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* tests.



**Fig. (3).** Effect of RTX on respiratory burst assays in T1D MOs. The respiratory burst (also referred to as oxidative burst) was performed by measurement of NO production and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels. The levels of NO production were measured by the sensitive Griess reaction. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels were measured spectrophotometrically using sensitive hydrogen peroxide assay after deproteinization and neutralization procedures. The results are presented as the mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hydrogen peroxide, MO: monocyte, NO: nitric oxide, CO/RTX-: monocytes from healthy controls untreated with RTX, CO/RTX+: monocytes from healthy controls treated with RTX, T1D/RTX-: T1D monocytes untreated with RTX, T1D/RTX+: T1D monocytes treated with RTX, T1D: type 1 diabetes, RTX: rituximab. For both NO production and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *p*-values were greater than 0.05 using Kruskal-Wallis. Significant difference highlighted by single comparison with RTX-untreated control monocytes or between RTX-treated and RTX-untreated T1D monocytes using Mann-Whitney *U* test is presented respectively with a black dot or with an asterisk: •*p* < 0.05, \**p* < 0.05.

### 3.2. Respiratory Burst is not Altered in T1D MOs, But RTX Treatment Lowers H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Release

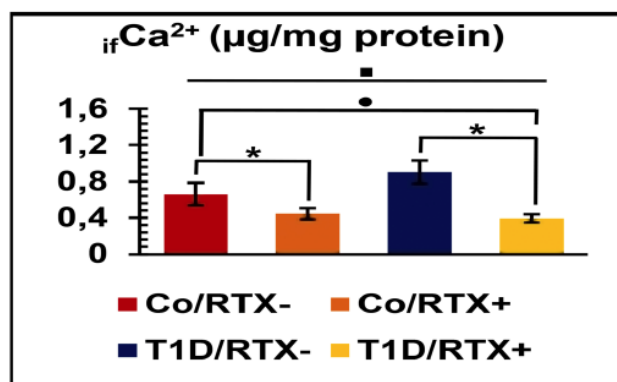
We see in Fig. (3) that the respiratory burst of T1D MOs, as evaluated by the production levels of NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seems to be similar to that of healthy control MOs (for the two variables, *p* > 0.05 by Mann-Whitney *U* test). Whereas, treatment with RTX induced a significant downregulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in MOs of T1D MOs as compared to RTX-untreated T1D MOs (*p* = 0.020 by Mann-Whitney *U* test). The comparison between all groups by Kruskal-Wallis test gave a *p*-value greater than 0.05 for both NO production and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release.

### 3.3. RTX has a Markedly Effect on *if*Ca<sup>2+</sup> Levels

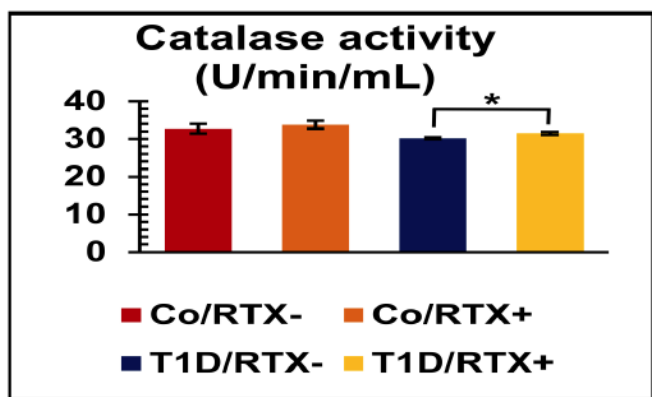
As illustrated in Fig. (4), the concentrations of *if*Ca<sup>2+</sup> were slightly increased in T1D MOs than in MOs from healthy controls (*p* > 0.05 by Mann-Whitney *U* test). Additionally, we notice that RTX treatment induced a significant decrease in *if*Ca<sup>2+</sup> levels in T1D MOs, as well as in healthy control MOs (for both comparisons, *p* < 0.05 by Mann-Whitney *U* test). *P*-value for multiple comparisons was equal to 0.013 by Kruskal-Wallis test.

### 3.4. RTX Increases Catalase Activity in T1D MOs

The results in Fig. (5) indicate that catalase activity was higher in MOs of healthy controls than in those of T1D patients; whereas the difference was not statistically significant (*p* > 0.05 by the Mann-Whitney *U* test). In addition, RTX



**Fig. (4).** Effect of RTX on the levels of intracellular free calcium ions in T1D MOs. Intracellular free calcium ions levels were biochemically measured by the ortho-cresolphthalein complexone (oCPC) method. The results are presented as the mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). *if*Ca<sup>2+</sup>: intracellular free calcium ions, MO: monocyte, CO/RTX-: monocytes from healthy controls untreated with RTX, CO/RTX+: monocytes from healthy controls treated with RTX, T1D/RTX-: T1D monocytes untreated with RTX, T1D/RTX+: T1D monocytes treated with RTX, T1D: type 1 diabetes, RTX: rituximab. Comparisons between all groups using Kruskal-Wallis test are presented with a black square: •*p* < 0.05. Significant difference highlighted by single comparison with RTX-untreated control monocytes or between RTX-treated and RTX-untreated monocytes using Mann-Whitney *U* test are presented respectively with a black dot or with an asterisk: •*p* < 0.05, \**p* < 0.05.



**Fig. (5).** Effect of RTX on catalase activity in T1D MOs. Catalase levels were evaluated spectrophotometrically by measuring the decrease in  $H_2O_2$  concentration. The results are presented as the mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). MO: monocyte, CO/RTX-: monocytes from healthy controls untreated with RTX, CO/RTX+: monocytes from healthy controls treated with RTX, T1D/RTX-: T1D monocytes untreated with RTX, T1D/RTX+: T1D monocytes treated with RTX, T1D: type 1 diabetes, RTX: rituximab.  $P$ -values were greater than 0.05 using Kruskal-Wallis test. \* $p < 0.05$  using Mann-Whitney  $U$  test.

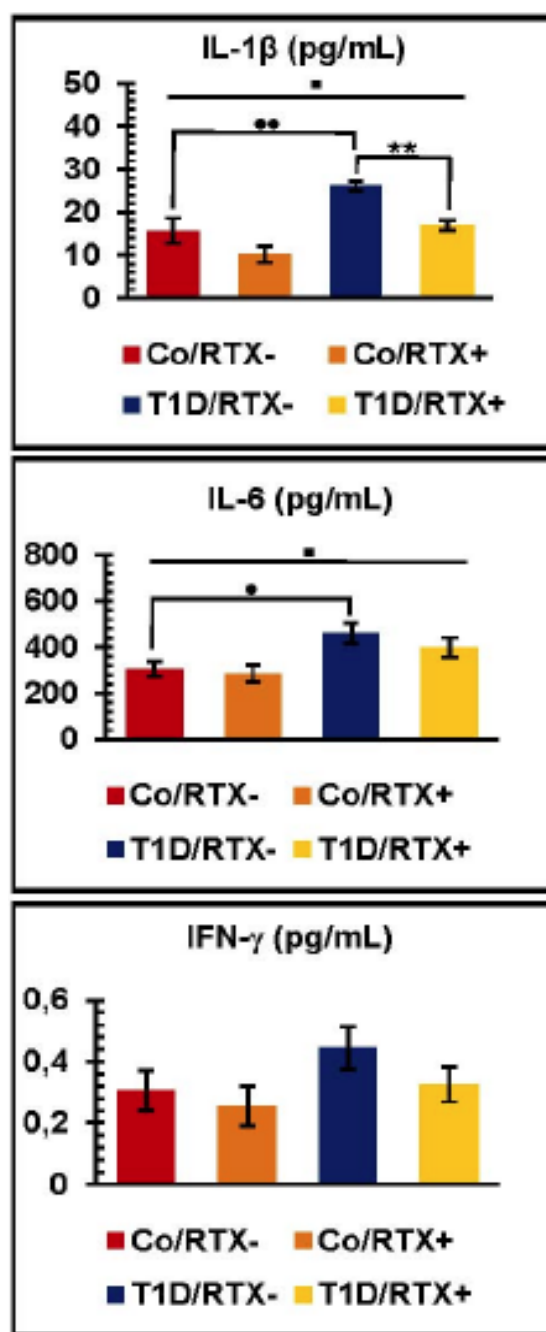
treatment significantly upregulated catalase activity in MOs of T1D in comparison to untreated T1D MOs ( $p = 0.029$  by Mann-Whitney  $U$  test).  $P$ -value was greater than 0.05 using Kruskal-Wallis test for all comparisons.

### 3.5. RTX Seems to have no Noticeable Effects on Proinflammatory Cytokine $IFN-\gamma$ Release, But have a Markedly Effect on the Production of $IL-1\beta$ and $IL-6$ by MOs

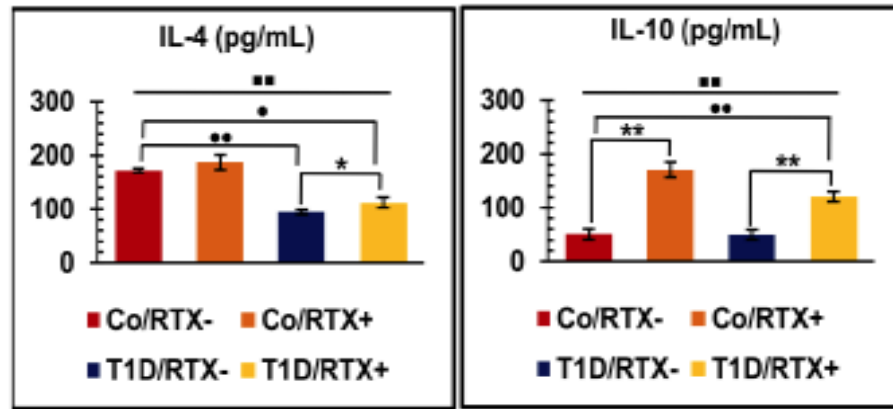
As indicated in Fig. (6), the  $IFN-\gamma$  levels were increased in T1D MOs when compared to healthy control MOs, but the difference did not reach the level of significance ( $p > 0.05$  by Mann-Whitney  $U$  test). Conversely, both  $IL-1\beta$  and  $IL-6$  levels were significantly increased in T1D MOs than in control MOs (respectively,  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$  by Mann-Whitney  $U$  test). Additionally, RTX treatment downregulated the production of the all cytokines, but to a relatively low degree for  $IL-6$  and  $IFN-\gamma$  compared to  $IL-1\beta$  (respectively,  $p > 0.05$  and  $p < 0.01$  by Mann-Whitney  $U$  test). Finally, the comparison between all groups by Kruskal-Wallis test showed significant differences only for  $IL-1\beta$  and  $IL-6$  (for the two variables,  $p < 0.05$ ).

### 3.6. RTX Induced Significant Effect on Anti-Inflammatory/Regulatory Cytokines $IL-4$ and $IL-10$ Release by MOs

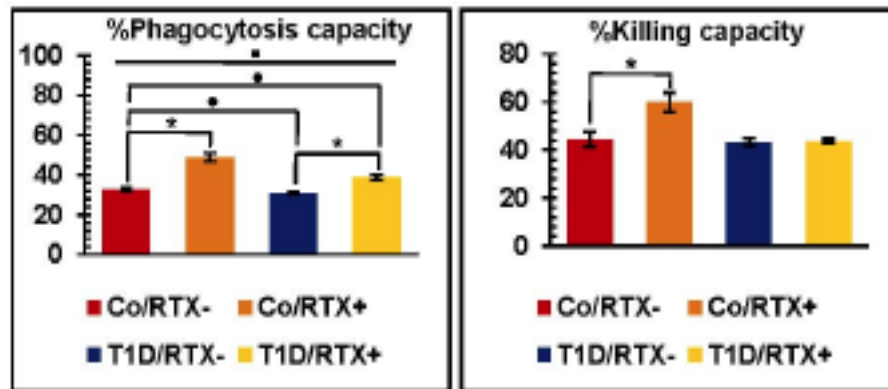
We notice in Fig. (7) that the production of  $IL-4$  was significantly decreased in T1D MOs as compared to healthy control MOs; however, that of  $IL-10$  was similar in both cells (respectively,  $p < 0.01$  and  $p > 0.05$  by Mann-Whitney  $U$  test). Otherwise, RTX treatment generated an important increase in both  $IL-4$  and  $IL-10$  concentrations in T1D MOs (respectively,  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  by Mann-Whitney  $U$  test).



**Fig. (6).** Effect of RTX on the production of proinflammatory cytokines  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$  and  $IFN-\gamma$  cytokines by human T1D MOs. Cytokine levels were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results are presented as the mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). IL: interleukin,  $IFN-\gamma$ : interferon gamma, MO: monocyte, CO/RTX-: monocytes from healthy controls untreated with RTX, CO/RTX+: monocytes from healthy controls treated with RTX, T1D/RTX-: T1D monocytes untreated with RTX, T1D/RTX+: T1D monocytes treated with RTX, T1D: type 1 diabetes, RTX: rituximab. \* $P < 0.05$  using Kruskal-Wallis test, and \*\* $p < 0.01$  using Mann-Whitney  $U$  test. Significant differences highlighted by single comparisons with RTX-untreated control monocytes using Mann-Whitney  $U$  test are presented with a black dot: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



**Fig. (7).** Effect of RTX on the production of anti-inflammatory/regulatory cytokines IL-4 and IL-10 by human T1D MOs. IL-4 and IL-10 were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Values correspond to the mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). MO: monocyte, CO/RTX-: monocytes from healthy controls untreated with RTX, CO/RTX+: monocytes from healthy controls treated with RTX, T1D/RTX-: T1D monocytes untreated with RTX, T1D/RTX+: T1D monocytes treated with RTX, T1D: type 1 diabetes, RTX: rituximab.  $^{**}P < 0.01$  by Kruskal-Wallis test for both IL-4 and IL-10. Significant differences highlighted by single comparisons between T1D/RTX- or T1D/RTX+ and RTX-untreated control monocytes using Mann-Whitney  $U$  test are presented with a black dot:  $\bullet p < 0.05$  and  $\bullet\bullet p < 0.01$ . Single comparisons between Co/RTX- and Co/RTX+ monocytes or between T1D/RTX- and T1D/RTX+ monocytes using Mann-Whitney  $U$  test are presented with an asterisk:  $\ast p < 0.05$  and  $\ast\ast p < 0.01$ .



**Fig. (8).** Effect of RTX on phagocytosis and killing capacities of T1D MOs. Phagocytosis and killing capacities were assayed using the antibiotic protection method. Values correspond to the mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). MO: monocyte, CO/RTX-: monocytes from healthy controls untreated with RTX, CO/RTX+: monocytes from healthy controls treated with RTX, T1D/RTX-: T1D monocytes untreated with RTX, T1D/RTX+: T1D monocytes treated with RTX, T1D: type 1 diabetes, RTX: rituximab. Comparisons between all groups using Kruskal-Wallis test are presented with a black square:  $\blacksquare p < 0.05$ . Significant difference highlighted by single comparison with RTX-untreated control monocytes or between RTX-treated and RTX-untreated monocytes using Mann-Whitney  $U$  test are presented respectively with a black dot or with an asterisk:  $\bullet p < 0.05$  and  $\ast p < 0.05$ .

Additionally, RTX showed a significant effect on the upregulation of the IL-10 release by healthy control MOs ( $p < 0.01$  by Mann-Whitney  $U$  test). For the two cytokines,  $p$ -values were less than 0.01 by Kruskal-Wallis test.

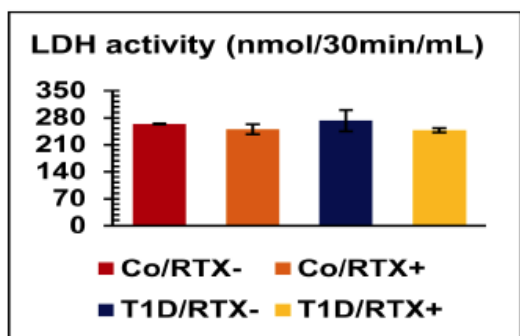
### 3.7. RTX has a Significantly Effect on Phagocytosis, but a no Markedly Effect on Killing Capacity in T1D MOs

The results of (Fig. 8) show that both phagocytosis and killing capacities were decreased in T1D MOs compared to MOs from healthy controls, but the difference did not reach a significant level for killing capacity (respectively,  $p < 0.05$  and  $p > 0.05$  by Mann-Whitney  $U$  test). Additionally, although RTX treatment induced an increase in phagocytosis and killing capacities in both control MOs and T1D MOs, the differ-

ence reach significance only for phagocytosis capacity ( $p < 0.05$  by Mann-Whitney  $U$  test). For all comparisons using Kruskal-Wallis test,  $p$ -values were less than 0.05 for phagocytosis capacity and greater than 0.05 for killing capacity.

### 3.8. RTX has No Noticeable Effects on MO LDH-Based Cytotoxicity

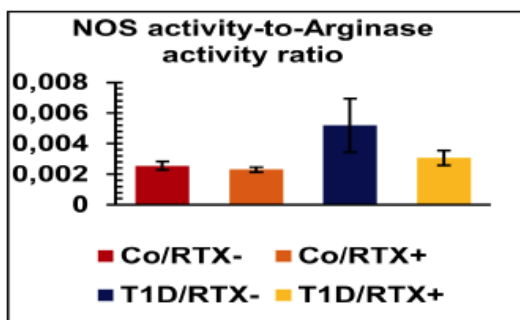
We see in Fig. (9) that the levels of LDH-based cytotoxicity were with no changes between all MO groups ( $p > 0.05$  by Kruskal-Wallis test). Additionally, although RTX induced downregulation of LDH release, whether in control or T1D MOs, the difference did not reach the significance level (for the two comparisons,  $p > 0.05$  by Mann-Whitney  $U$  test).



**Fig. (9).** Effect of RTX on LDH-based cytotoxicity in T1D MOs. The LDH-based cytotoxicity assay was based on the reduction of NAD substrate to NADH. Values correspond to the mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). MO: monocyte, CO/RTX-: monocytes from healthy controls untreated with RTX, CO/RTX+: monocytes from healthy controls treated with RTX, T1D/RTX-: T1D monocytes untreated with RTX, T1D/RTX+: T1D monocytes treated with RTX, LDH: lactate dehydrogenase, T1D: type 1 diabetes, RTX: rituximab. *P*-values were greater than 0.05 using both Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* tests.

### 3.9. RTX Decreased the Ratio of NOS Activity-to-Arginase Activity

As indicated in Fig. (10), NOS activity-to-arginase activity ratio was increased in T1D MOs than in control MOs, but to a low significance level ( $p > 0.05$  by Mann-Whitney *U* test). By contrast, the balance of NOS activity versus arginase activity was decreased in RTX-treated MOs when compared to RTX-untreated MOs; nevertheless, the difference did not reach the level of statistical significance ( $p > 0.05$  by Mann-Whitney *U* test). Comparisons using the Kruskal-Wallis test gave a *p*-value  $> 0.05$ .



**Fig. (10).** RTX decrease the ratio of NOS activity-to-arginase activity in T1D MOs. The results are presented as the mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). IL: interleukin, IFN- $\gamma$ : interferon gamma, MO: monocyte, NOS: nitric oxide synthase, CO/RTX-: monocytes from healthy controls untreated with RTX, CO/RTX+: monocytes from healthy controls treated with RTX, T1D/RTX-: T1D monocytes untreated with RTX, T1D/RTX+: T1D monocytes treated with RTX, T1D: type 1 diabetes, RTX: rituximab. *P*-values were greater than 0.05 using both Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* tests.

## 4. DISCUSSION

RTX is a chimeric monoclonal anti-CD20 antibody, increasingly used as a treatment for autoimmune disease, including T1D [30]. It has been considered as a potential agent for

the prevention of the disease by acting as immunosuppressive drug. Hence, a trial conducted by Trial-Net has demonstrated that four doses of RTX can preserve  $\beta$ -cell function within a one-year period in patients with newly diagnosed T1D [10].

MOs are the dominant effectors cells during immunotherapy with monoclonal anti-CD20 RTX antibody, by depletion of B-cells [14]. B-cells function as antigen presenting cells (APCs), activate autoreactive T cells and produce autoantibodies against pancreatic  $\beta$ -cell antigens. RTX therapy in patients with newly diagnosed T1D leads to improved proliferative T-cells responses to islet-specific autoantigens associated with T1D [31]. Nevertheless, the actual mechanism of the effect of RTX in T1D is not fully understood. Several studies suggest that RTX may reduce the production of proinflammatory cytokines that increase the immune response locally within the pancreas or the peripancreatic lymph nodes [32]. It also plays an essential role in the induction of autoreactive B-cells depletion at the recent-onset of the disease. Additionally, it would be possible that the antigen presentation by B-cells can be altered by RTX [12]. Moreover, in a study conducted in pre-diabetic NOD mice, anti-CD20 therapy partially protected these mice against the disease development and restored glycaemia in one third of newly emerged diabetic mice. Furthermore, it has been suggested that protection against the disease is associated with the generation of regulatory T (Treg) cells and Breg cells [33, 34].

Considering these new insights, our attention was focused for the first time on the *ex vivo* effect of RTX on the functional activities of MOs in recent-onset human T1D.

### 4.1. Effect of RTX on Activities of NOS and Arginase, and on Respiratory/Oxidative Burst

The increase in oxidative stress is one of the major factors involved in the development and progression of T1D and its complications. MOs can produce various reactive nitrogen and oxygen species (RNS, ROS), especially NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that have strong cytotoxic activities against different pathogens. It has been reported that T1D patients are characterized by increased NO production by classically activated macrophages [3], as well as by pancreatic  $\beta$ -cells [35]. It is produced in excessive amounts by MOs *via* iNOS in response to proinflammatory cytokines [36]. So the NO can act as a second messenger of proinflammatory cytokines and can activate caspases leading to the  $\beta$ -cells death [37, 38]. Nevertheless, its action could be countered by the enzyme arginase, which is known to compete with the enzyme NOS for the same L-arginine substrate, and to act as an anti-inflammatory mediators of alternative MOs [39, 40]. In addition, numerous studies have reported that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is increased in the plasma and tissues of diabetic patients [41, 42], and directly involved in tissue damage and complications. It has the ability to influence a variety of essential processes, including presentation of antigen and immune modulation, as well as to activate signaling pathways stimulating cell proliferation, differentiation, migration or apoptosis [43]. It also promotes the synthesis of proinflammatory cytokines like IL-1 $\beta$  by MOs-macrophages [44, 45]. In our study, we observed that there are no significant differences in the production levels of NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as well as in NOS activity and the ratio of NOS activity-to-arginase activity between T1D MOs and healthy control MOs; while, the arginase activity was significantly decreased. Nevertheless, our outcomes regarding the decreased arginase activity are consistent

with recent studies in T1D patients [46, 47], whereas the results on the levels of NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> did not corroborate with ours. Additionally, RTX treatment slightly downregulated the NOS activity and upregulated arginase activity. So we cannot make comparison against other results given that to the best of our knowledge, there are no mechanistic studies on the effect of RTX on respiratory burst and NOS and arginase activities.

#### 4.2. Effect of RTX on $i_fCa^{2+}$

Several lines of evidence suggest an important role for intracellular calcium in the activation of MOs. First, it has been shown that calcium induces major histocompatibility (MHC) class II antigen expression on MOs [48] and improves the respiratory burst [49]. Additionally, calcium antagonists have been revealed to inhibit MO-macrophage activation for cytotoxicity [50, 51]. Moreover, it has recently been reported that calcium is required for the secretion of IL-1 $\beta$  as a central event in the initiation of inflammation in primary human MOs [52]. Furthermore, it has been reported that in pancreatic  $\beta$ -cells, the high level of calcium caused by proinflammatory cytokines is a well-established trigger for the destruction and death of pancreatic  $\beta$ -cells [53]. Therefore, calcium influx can play an important role in proinflammatory cytokine signaling cascades that may lead to cell death or apoptosis. In our study, we observed that although  $i_fCa^{2+}$  levels were not significantly different between T1D MOs and healthy control MOs, RTX treatment significantly downregulated their levels. This should be a further argument about the effect of RTX treatment in regulating the inflammatory activity of MOs at the beginning of human T1D. The difficulty lies in the fact that there is, to our knowledge, no similar research has been done allowing us to compare our results, although this does not preclude recalling that a number of studies have focused on the effects of RTX on flux and calcium signaling under other contexts, using CD20<sup>+</sup> cells. Thus, it has previously been reported that RTX could have the ability to induce calcium flux after binding to CD20 [54]. Mechanistically, the increase in intracellular calcium levels has been linked to the effect of RTX that induces translocation of CD20 to microdomains at the plasma membrane, specialized in signal transduction and referred to as lipid rafts [55].

#### 4.3. Effect of RTX on Catalase Activity

Catalase is an antioxidant enzyme particularly effective when the oxidative stress level is high. It plays a significant role in the development of tolerance to oxidative stress in immune cells [56]. Catalase has a relative importance in the protection of MOs against oxidative damage and increase the phagocytic and chemotactic responsiveness of MOs [57]. It also strengthens and regulates their redox homeostasis [58]. Likewise, catalase can induce alternative M2 macrophage activation and inhibits classical M1 macrophage activation and inflammation [59]. In the current study, we found that RTX induces an increase in the level of catalase in T1D MOs. To our knowledge, there is no similar study on T1D to make a direct comparison with our results.

#### 4.4. Effect of RTX on the Production of Proinflammatory Cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and IFN- $\gamma$ Cytokines by Human T1D MOs

Different studies suggest that T1D is characterized by intra-islet expression of proinflammatory mediators. Accord-

ingly, our results are consistent with recent findings demonstrating that the concentrations of IL-6 and IFN- $\gamma$  are increased in T1D [4, 46, 47, 60, 61]. In our study, IL-1 $\beta$  levels seem to be increased in T1D MOs. Mechanistically, IL-1 $\beta$  has been reported to may have a key role to play in MO trafficking [62], and cytotoxicity against  $\beta$ -cells, inducing the formation of oxygen free radicals and NO [63]. Therefore, it has been commonly used as one of the best markers of inflammation. Additionally, MOs of T1D patients have been shown to be able to induce CD4<sup>+</sup> T cells to produce proinflammatory cytokine IFN- $\gamma$  [4], which is considered as one of the most important endogenous mediators that increase inflammation in autoimmune diseases, promoting the activity of Th1 cells and tends to downregulate that of Th2 cells [64]. It has previously been reported that IFN- $\gamma$  levels are increased in the supernatants of PBMC cultures from T1D patients during the first three months after the diagnosis of the disease [65]. Moreover, IFN- $\gamma$  can potentiate the generation of diabetogenic CD8<sup>+</sup> T cells that infiltrate the pancreatic islets, and attack insulin-secreting  $\beta$ -cells [66, 67]. Interestingly, a large number of epidemiological studies suggest both protective and pathogenic roles of IL-6 in the pathogenesis of T1D [68]. IL-6 is produced by antigen presenting cells in response to external stimuli, such as IL-1 $\beta$ . Nevertheless, the real role of IL-6 in T1D is not yet well established. A first report demonstrated a significantly reduced incidence of T1D with IL-6 blockade in non-obese diabetic (NOD) mouse model [69]. Other results support an increase in IL-6 production by MOs from T1D subjects [4]. Finally, treatment with RTX slightly decreased the IFN- $\gamma$  levels on MOs production, which is consistent with previous studies performed both in human and mice with autoimmune diseases [70-72]. Although the effect of RTX on MOs production of IL-6 appears to be globally moderate but more pronounced on the production of IL-1 $\beta$ , our results should be confirmed by further investigations in the near future, especially in a mechanistic context.

#### 4.5. Effect of RTX on the Production of Anti-Inflammatory/Regulatory Cytokines IL-4 and IL-10 by Human T1D MOs

It has been reported that the loss of  $\beta$ -cell function and viability is not caused only by increased generation of proinflammatory cytokines, but it can also be provoked by a concomitant loss of anti-inflammatory cytokines, suggesting that targeting of anti-inflammatory pathways might offer therapeutic potential in T1D [73]. It has been reported that both anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 suppress generation of Th1 cells, and consequently their production of proinflammatory cytokines, including IL-1 and IFN- $\gamma$  [74]. In the current study, we observed that unlike IL-10, the levels of IL-4 production were decreased in T1D MOs. IL-4 can reduce the inflammatory response by limiting the action of IL-1 $\beta$  [75]. In addition, pancreatic  $\beta$ -cells can be protected by IL-4, which induces the formation of Th2 cells, inflammatory-inhibiting cytokines, and leading to cell survival by inhibiting Th1 activity [73]. It has been reported that the increase in IL-4 production by alternatively activated macrophage is usually accompanied by IL-10 secretion, resulting in a decrease in pathological inflammation and autoimmune reactions. Of note, IL-10 is mostly produced by MOs and macrophages [76, 77]. It is considered to be one of the main anti-inflammatory cytokines with regulatory functions in

controlling and preventing inflammation and autoimmune diseases, including T1D [78]. Thus, IL-10 is considered as a major inhibitor of proliferation of Th1 cells and the production of proinflammatory cytokines, which can minimize leukocyte maturation and recruitment, as well as inflammation. Additionally, IL-10 induces Th2 responses by increasing levels of anti-inflammatory cytokines, like IL-4 [79]. IL-10 is also a potent inhibitor of the different functions of MOs-macrophages and their cytotoxicity [80, 81], and can induce a decrease in the expression of MHC class II molecules and antigen presentation, as well as a decrease in B7 costimulatory molecules [82]. Finally, observation regarding the upregulation of both IL-4 and IL-10 in RTX-treated MOs should elicit a mechanistic explanation. Therefore, it would be of great interest to investigate whether or not RTX has the ability to bind to Fc $\gamma$ R on the surface of a subpopulation of MO cells secreting anti-inflammatory/regulatory cytokines. Additionally, knowing that signal transduction across Fc $\gamma$ Rs can vary with signal strength, the density of RTX and the level of its interaction with Fc $\gamma$ R would also be a strong determining factor on the production of cytokines. Of note, it has been reported that at moderate IgG densities, especially in the presence of complement, effective phagocytosis occurs in the absence of cytokine alterations, whereas at slightly higher IgG densities, the production of IL-12 is stopped and induction of IL-10 occurs [83]. Moreover, cytokines secretion belongs in the balance between activating and inhibitory Fc $\gamma$ Rs [84]. IgG immune complexes stimulate effectors cells that transmit both an inflammatory signal by triggering activating receptor Fc $\gamma$ RIIa which carries an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) and a tolerogenic signal by triggering inhibitory receptor Fc $\gamma$ RIIb that contain immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM). So perturbations of the balance between activating and inhibitory Fc $\gamma$ Rs may affect cytokine production [85].

#### 4.6. Effect of RTX on Phagocytosis and Killing Capacities

Among the multiple functional roles of MOs, the phagocytic activity and intracellular pathogen killing capacity have been reported in T1D. Some researchers have found that phagocytic capacity was not different between patients with T1D and healthy controls [47, 86, 87]. Other ones have reported decreased functions (chemotaxis, phagocytosis, killing) of diabetic polymorphonuclear cells and diabetic MOs-macrophages compared to cells of controls [88], which corroborates with our outcomes. Otherwise, the incidence of infections and their complications is increased in patients with T1D. Among the main causative factors for such infections are undoubtedly linked to abnormalities of the innate immune response, including phagocytic capacity and microbial killing. Of great interest, antibody-dependent phagocytosis (ADP) has been considered as a major mediator of monoclonal antibodies (mAbs) cytotoxicity [89], and therefore one of the best ways to improve the immune functions of phagocytes. Nevertheless, our study demonstrated that RTX treatment has a markedly effect on improving phagocytosis of T1D MOs but not on killing capacities. We suggest starting further studies evaluating the effects of RTX on MOs, both in the presence and absence of complement and other circulating opsonic proteins, but also with therapeutic combinations of drugs known to enhance phagocytic function, like anti-CD47 antibody [90], especially by the use of rituximab-coated CD20<sup>+</sup> cells.

#### 4.7. Effect of RTX on MO LDH-Based Cytotoxicity

LDH is a stable cytoplasmic enzyme implicated in lactic fermentation, released by cells into the extracellular medium when they undergo membrane damage [91]. Additionally, LDH release is commonly used as an indicator of the effects on cell growth inhibition and/or cell death [92]. For our part, we demonstrated for the first time that the therapeutic use of RTX would not have any significant adverse *ex vivo* effects on the survival of the monocyte cell at the beginning of T1D.

#### CONCLUSION

MOs are necessary for the activation of cytotoxic cells that can destroy pancreatic  $\beta$ -cells by the secretion of proinflammatory cytokines and increased respiratory/oxidative burst. Their functions could be affected by different mediators or exogenous molecules, which are used as part of targeted therapies. RTX is increasingly used as an effective treatment in the management of several autoimmune diseases, including T1D. The actual mechanism of the effect of RTX in T1D is not yet uncertain. In our knowledge, this is the first study exploring the role of RTX on the modulation of the production of proinflammatory cytokines by MOs in recent-onset T1D. Our results demonstrated that RTX can differentially modulate both the abnormal functional activities of MOs and the activation of proinflammatory pathways, and can promote the production of anti-inflammatory and regulatory cytokines by MOs at the beginning of the disease. Nevertheless, it would be of great interest to check mechanistically the effect of RTX on other signaling pathways implicated in the polarization of MOs. Additionally, to expand phagocytic function, we propose to explore novel studies evaluating the effects of RTX on MOs, both in the presence and absence of complement and other circulating opsonic proteins, especially anti-CD47 antibody. From a molecular point of view, it would be interesting to study the polymorphism existing at the Fc $\gamma$ R receptors (notably the Fc $\gamma$ RIIIa receptor) of the MOs that play a role in the affinity for human IgG1 and thus increase the efficacy of ADCC.

#### LIST OF ABBREVIATIONS

ADCC	=	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
AICs	=	Anti-Inflammatory Cytokines
APC	=	Antigen-Presenting Cell
AbPC	=	Autoantibody-Producing Cell
Breg	=	Regulatory B-Cell
CD	=	Cluster of Differentiation
CDC	=	Complement-Dependent Cytotoxicity
EDTA	=	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
ELISA	=	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fc $\gamma$ R	=	Fragment Crystallizable Region Gamma Receptor
FBS	=	Fetal Bovine Serum
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	=	Hydrogen Peroxide
HCl	=	Hydrochloric Acid
<sub>i</sub> Ca <sup>2+</sup>	=	Intracellular Free Calcium Ions
IFN	=	Interferon
Ig	=	Immunoglobulin
IL	=	Interleukin
iNOS	=	Inductible Nitric Oxide Synthase
ITAM	=	Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif
ITIM	=	Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motif



LDH	=	Lactate Dehydrogenase
LPS	=	lipopolysaccharide
M1	=	Classically Activated Macrophage
M2	=	Alternatively Activated Macrophage
mAbs	=	Monoclonal Antibodies
MnCl <sub>2</sub>	=	Manganese(II) Chloride
MO	=	Monocyte
NO	=	Nitric Oxide
NOD	=	Non Obese Diabetic
NOS	=	Nitric Oxide Synthase
OCP	=	Orthocresolphthalein Complexone
PBMCs	=	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	=	Phosphate Buffered Saline
PICs	=	Proinflammatory Cytokines
ROS	=	Reactive Oxygen Species
RNS	=	Reactive Nitrogen Species
RPMI	=	Roswell Park Memorial Institute
RTX	=	Rituximab
T1D	=	Type 1 Diabetes
TBET	=	Trypan Blue Exclusion Test
TCA	=	Trichloroacetic Acid
Th1	=	Type 1 T helper Cells
Th2	=	Type 2 T helper Cells
Treg	=	Regulatory T cell
VCl <sub>3</sub>	=	Trichlorovanadium

#### ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

This study was approved by the Ethical Committee of the University of Tlemcen (Tlemcen, Algeria) (Thesis registration n° DB BHL 12).

#### HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

The current study was conducted in accordance with the ethical principles regarding human experimentation, conforming to the Helsinki Declaration standards.

#### CONSENT FOR PUBLICATION

A written informed consent was obtained from all legally authorized representatives of type 1 diabetic patients and healthy control donors before the study.

#### AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

Not applicable.

#### FUNDING

None.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest financial or otherwise.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr. Imène Belhassena (Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, University of Tlemcen) for her valuable technical support.

#### REFERENCES

- [1] Herold, K.C.; Usmani-Brown, S.; Ghazi, T.; Lebastchi, J.; Beam, C.A.; Bellin, M.D.; Ledizet, M.; Sosenko, J.M.; Krischer, J.P.; Palmer, J.P.  $\beta$  cell death and dysfunction during type 1 diabetes development in at-risk individuals. *J. Clin. Invest.*, **2015**, *125*(3), 1163-1173.
- [2] Rabinovitch, A.; Suarez-Pinzon, W.L. Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes. *Cell Biochem. Biophys.*, **2007**, *48*(2-3), 159-163.
- [3] Yoon, J.W.; Jun, H.S. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am. J. Ther.*, **2005**, *12* (6), 580-591.
- [4] Bradshaw, E.M.; Raddassi, K.; Elyaman, W.; Orban, T.; Gottlieb, P.A.; Kent, S.C.; Hafler, D.A. Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J. Immunol.*, **2009**, *183*(7), 4432-4439.
- [5] Bendtzen, K.; Mandrup-Poulsen, T.; Nerup, J.; Nielsen, J.H.; Dinarello, C.A.; Svenson, M. Cytotoxicity of human  $\pi$  7 interleukin-1 for pancreatic islets of langerhans. *Science*, **1986**, *232*(4757), 1545-1547.
- [6] Aribi, M.; Moulessehoul, S.; Kendouci-Tani, M.; Benabadi, A.B.; Hichami, A.; Khan, N.A. relationship between interleukin-1beta and lipids in type 1 diabetic patients. *Med. Sci. Monit.*, **2007**, *13*(8), CR372-CR378.
- [7] Azar, S.T.; Tamim, H.; Beyhum, H.N.; Habbal, M.Z.; Almawi, W.Y. Type I (insulin-dependent) diabetes is a th1- and th2-mediated autoimmune disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **1999**, *6*(3), 306-310.
- [8] Calabrese, L.H.; Rose-John, S. IL-6 biology: Implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nat. Rev. Rheumatol.*, **2014**, *10*(12), 720-727.
- [9] Semnani, R.T.; Mahapatra, L.; Moore, V.; Sanprasert, V.; Nutman, T. B. Functional and phenotypic characteristics of alternative activation induced in human monocytes by interleukin-4 or the parasitic nematode *brugia malayi*. *Infect. Immun.*, **2011**, *79*(10), 3957-3965.
- [10] Pescovitz, M.D.; Greenbaum, C.J.; Krause-Steinrauf, H.; Becker, D.J.; Gitelman, S.E.; Goland, R.; Gottlieb, P.A.; Marks, J.B.; McGee, P. F.; Moran, A. M.; Raskin, P.; Rodriguez, H. Rituximab, b-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N. Engl. J. Med.*, **2009**, *361*(22), 2143-2152.
- [11] Johnson, P.; Glennie, M. The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells. *Semin. Oncol.*, **2003**, *30*(1), 3-8.
- [12] Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer*, **2001**, *1*(2), 118-129.
- [13] Stern, M.; Herrmann, R. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: Present and promise. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2005**, *54*(1), 11-29.
- [14] Uchida, J.; Hamaguchi, Y.; Oliver, J.A.; Ravetch, J.V.; Poe, J.C.; Haas, K.M.; Tedder, T.F. The innate mononuclear phagocyte network depletes b lymphocytes through fc receptor-dependent mechanisms during anti-cd20 antibody immunotherapy. *J. Exp. Med.* **2004**, *199*(12), 1659-1669.
- [15] Ravetch, J.V. Fc receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **1997**, *9*(1), 121-125.
- [16] Richardson, A.; Fedoroff, S. Quantification of cells in culture. In *Protocols for Neural Cell Culture*; Humana Press, Totowa, NJ, 1997; pp 219-233.
- [17] Kitamura, N.; Nishinarita, S.; Takizawa, T.; Tomita, Y.; Horie, T. Cultured human monocytes secrete fibronectin in response to activation by proinflammatory cytokines. *Clin. Exp. Immunol.* **2000**, *120*(1), 66-70.
- [18] Laverny, G.; Penna, G.; Vetrano, S.; Correale, C.; Nebuloni, M.; Danese, S.; Adorini, L. Efficacy of a potent and safe vitamin d receptor agonist for the treatment of inflammatory bowel disease. *Immunology Letters*, **2010**, *131*(1), 49-58.
- [19] Beum, P.V.; Kennedy, A.D.; Williams, M.E.; Lindorfer, M.A.; Taylor, R.P. The shaving reaction: Rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by thp-1 monocytes. *J. Immunol.*, **2006**, *176*(4), 2600-2609.
- [20] Rafiq, S.; Butchar, J.P.; Cheney, C.; Mo, X.; Trotta, R.; Caligiuri, M.; Jarjoura, D.; Tridandapani, S.; Muthusamy, N.; Byrd, J.C. Comparative assessment of clinically utilized cd20-directed antibodies in chronic lymphocytic leukemia cells reveals divergent nk

- cell, monocyte, and macrophage properties. *J. Immunol.*, **2013**, *190*(6), 2702-2711.
- [21] Diem, K.; Magaret, A.; Klock, A.; Jin, L.; Zhu, J.; Corey, L. Image analysis for accurately counting cd4+ and cd8<sup>+</sup> t cells in human tissue. *J. Virol. Methods*, **2015**, *222*, 117-121.
- [22] Safi, W.; Kuehl, A.; Nüssler, A.; Eckstein, H.H.; Pelisek, J. Differentiation of human cd14<sup>+</sup> monocytes: An experimental investigation of the optimal culture medium and evidence of a lack of differentiation along the endothelial line. *Exp. Mol. Med.*, **2016**, *48*, e227.
- [23] Nouari, W.; Ysmail-Dahlouk, L.; Aribi, M. Vitamin d3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Immunopharmacol.*, **2016**, *30*, 94-101.
- [24] Aribi, M. Macrophage bactericidal assays. *Methods Mol. Biol.*, **2018**, *1784*, 135-149.
- [25] Guevara, I.; Iwanejko, J.; Dembińska-Kieć, A.; Pankiewicz, J.; Wanat, A.; Anna, P.; Gołbek, I.; Bartuś, S.; Malczewska-Malec, M.; Szczudlik, A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple griess reaction. *Clinica. Chimica. Acta.*, **1998**, *274*(2), 177-188.
- [26] Rouzaut, A.; Subirá, M.L.; de Miguel, C.; Domingo-de-Miguel, E.; González, A.; Santiago, E.; López-Moratalla, N. Co-expression of inducible nitric oxide synthase and arginases in different human monocyte subsets. apoptosis regulated by endogenous NO. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1999**, *1451*(2), 319-333.
- [27] Gitelman, H.J. An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal. Biochem.*, **1967**, *18*(3), 521-531.
- [28] Aebi, H. Catalase. In *Methods of Enzymatic Analysis*; Elsevier, **1974**, pp 673-684.
- [29] Olsen, C.H. Statistics in infection and immunity revisited. *Infect. Immun.*, **2014**, *82*(3), 916-920.
- [30] Pedersen, A.E.; Jungersen, M.B.; Pedersen, C.D. Monocytes mediate shaving of b-cell-bound anti-cd20 antibodies. *Immunology*, **2011**, *133*(2), 239-245.
- [31] Xia, C.Q.; Liu, Y.; Guan, Q.; Clare-Salzler, M.J. Antibody-Based And Cellular Therapies Of Type 1 Diabetes. In *Type 1 Diabetes*; Escher, A., Ed.; InTech, 2013.
- [32] Xu, X.; Shi, Y.; Cai, Y.; Zhang, Q.; Yang, F.; Chen, H.; Gu, Y.; Zhang, M.; Yu, L.; Yang, T. Inhibition of increased circulating Tfh cell by anti-cd20 monoclonal antibody in patients with type 1 diabetes. *PLoS ONE*, **2013**, *8*(11), e79858.
- [33] Bour-Jordan, H.; Bluestone, J.A. B cell depletion: A novel therapy for autoimmune diabetes? *J. Clin. Invest.*, **2007**, *117*(12), 3642-3645.
- [34] Xiu, Y.; Wong, C.P.; Bouaziz, J.D.; Hamaguchi, Y.; Wang, Y.; Pop, S.M.; Tisch, R.M.; Tedder, T.F. B lymphocyte depletion by cd20 monoclonal antibody prevents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in fcγr effector functions. *J. IMMUNOL.*, **2008**, *180*(5), 2863-2875.
- [35] Thomas, H.E.; Darwiche, R.; Corbett, J.A.; Kay, T.W.H. Interleukin-1 plus -interferon-induced pancreatic -cell dysfunction is mediated by -cell nitric oxide production. *Diabetes*, **2002**, *51*(2), 311-316.
- [36] Reiling, N.; Ulmer, A.J.; Duchrow, M.; Ernst, M.; Flad, H.D.; Hauschildt, S. Nitric oxide synthase: MRNA expression of different isoforms in human monocytes/macrophages. *Eur. J. Immunol.*, **1994**, *24*(8), 1941-1944.
- [37] Cunningham, J.M.; Mabley, J.G.; Green, I.C. Interleukin 1beta-mediated inhibition of arginase in RINm5F cells. *Cytokine*, **1997**, *9*(8), 570-576.
- [38] Elliott, T.G.; Cockcroft, J.R.; Groop, P.H.; Viberti, G.C.; Ritter, J.M. Inhibition of nitric oxide synthesis in forearm vasculature of insulin-dependent diabetic patients: Blunted vasoconstriction in patients with microalbuminuria. *Clin. Sci.*, **1993**, *85*(6), 687-693.
- [39] Rath, M.; Müller, I.; Kropf, P.; Closs, E.I.; Munder, M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Front. Immunol.*, **2014**, *5*(532).
- [40] Zhai, Z.; Solco, A.; Wu, L.; Wurtele, E.S.; Kohut, M.L.; Murphy, P. A.; Cunnick, J.E. Echinacea increases arginase activity and has anti-inflammatory properties in raw 264.7 macrophage cells, indicative of alternative macrophage activation. *J. Ethnopharmacol.*, **2009**, *122*(1), 76-85.
- [41] Sato, Y.; Hotta, N.; Sakamoto, N.; Matsuoka, S.; Ohishi, N.; Yagi, K. Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem. Med.*, **1979**, *21*(1), 104-107.
- [42] Giugliano, D.; Ceriello, A.; Paolisso, G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, **1996**, *19*(3), 257-267.
- [43] Veal, E. A.; Day, A. M.; Morgan, B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol. Cell.*, **2007**, *26*(1), 1-14.
- [44] Curtsinger, J.M.; Schmidt, C.S.; Mondino, A.; Lins, D.C.; Kedl, R.M.; Jenkins, M.K.; Mescher, M.F. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.*, **1999**, *162*(6), 3256-3262.
- [45] Tse, H.M.; Milton, M.J.; Piganelli, J.D. Mechanistic analysis of the immunomodulatory effects of a catalytic antioxidant on antigen-presenting cells: Implication for their use in targeting oxidation-reduction reactions in innate immunity. *Free Radic. Biol. Med.*, **2004**, *36*(2), 233-247.
- [46] Ysmail-Dahlouk, L.; Nouari, W.; Aribi, M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 down-modulates the production of proinflammatory cytokines and nitric oxide and enhances the phosphorylation of monocyte-expressed stat6 at the recent-onset type 1 diabetes. *Immunol. Lett.*, **2016**, *179*, 122-130.
- [47] Benghalem, I.; Meziane, W.; Hadjidj, Z.; Ysmail-Dahlouk, L.; Belamri, A.; Mouhadjer, K.; Aribi, M. High-density lipoprotein immunomodulates the functional activities of macrophage and cytokines produced during *ex vivo* macrophage-CD4<sup>+</sup> T cell crosstalk at the recent-onset human type 1 diabetes. *Cytokine*, **2017**, *96*, 59-70.
- [48] Bunbury, A.; Potolicchio, I.; Maitra, R.; Santambrogio, L. Functional analysis of monocyte mhc class ii compartments. *FASEB J.*, **2008**, *23*(1), 164-171.
- [49] McLeish, K.R.; Dean, W.L.; Wellhausen, S.R.; Stelzer, G.T. Role of intracellular calcium in priming of human peripheral blood monocytes by bacterial lipopolysaccharide. *Inflammation*, **1989**, *13*(6), 681-692.
- [50] Wright, B.; Zeidman, I.; Greig, R.; Poste, G. Inhibition of macrophage activation by calcium channel blockers and calmodulin antagonists. *Cell. Immunol.*, **1985**, *95*(1), 46-53.
- [51] Guest, C.B.; Deszo, E.L.; Hartman, M.E.; York, J.M.; Kelley, K.W.; Freund, G.G. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase kinase alpha is expressed by monocyte cells and regulates the activation profile. *PLoS ONE*, **2008**, *3*(2), e1606.
- [52] Ainscough, J.S.; Gerberick, G.F.; Kimber, I.; Dearman, R.J. Interleukin-1β processing is dependent on a calcium-mediated interaction with calmodulin. *J. Biol. Chem.*, **2015**, *290*(52), 31151-31161.
- [53] Ramadan, J.W.; Steiner, S.R.; O'Neill, C.M.; Nunemaker, R.S. The central role of calcium in the effects of cytokines on beta-cell function: Implications for type 1 and type 2 diabetes. *Cell Calcium*, **2011**, *50*(6), 481-490.
- [54] Walshe, C.A.; Beers, S.A.; French, R.R.; Chan, C.H.T.; Johnson, P.W.; Packham, G.K.; Glennie, M.J.; Cragg, M.S. Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon b cell antigen receptor signaling. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*(25), 16971-16984.
- [55] Janas, E.; Priest, R.; Wilde, J.I.; White, J.H.; Malhotra, R. S. Rituxan (anti-CD20 antibody)-induced translocation of CD20 into lipid rafts is crucial for calcium influx and apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.*, **2005**, *139*(3), 439-446.
- [56] Wassmann, S.; Wassmann, K.; Nickenig, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*, **2004**, *44*(4), 381-386.
- [57] Voetman, A.A.; Roos, D. Endogenous catalase protects human blood phagocytes against oxidative damage by extracellularly generated hydrogen peroxide. *Blood*, **1980**, *56*(5), 846-852.
- [58] Zhu, H.; Jia, Z.; Zhang, L.; Yamamoto, M.; Misra, H.P.; Trush, M.A.; Li, Y. Antioxidants and phase 2 enzymes in macrophages: Regulation by NRF2 signaling and protection against oxidative and electrophilic stress. *Exp. Biol. Med.*, **2008**, *233*(4), 463-474.
- [59] Park, Y.S.; Uddin, M.J.; Piao, L.; Hwang, I.; Lee, J.H.; Ha, H. Novel role of endogenous catalase in macrophage polarization in adipose tissue <https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/8675905/abs/> (accessed Apr 20, 2018).
- [60] Gabbay, M.A.L.; Sato, M.N.; Duarte, A.J.S.; Dib, S.A. Serum titres of anti-glutamic acid decarboxylase-65 and anti-ia-2 autoantibodies are associated with different immunoregulatory milieu in newly diagnosed type 1 diabetes patients. *Clin. Exp. Immunol.*, **2012**, *168*(1), 60-67.
- [61] Trinanes, J.; Salido, E.; Fernandez, J.; Rufino, M.; Gonzalez-Posada, J.M.; Torres, A.; Hernandez, D. Type 1 diabetes increases the expression of proinflammatory cytokines and adhesion mole-

- cules in the artery wall of candidate patients for kidney transplantation. *Diabetes Care*, **2012**, *35*(2), 427-433.
- [62] Sanda, S.; Bollyky, J.; Standifer, N.; Nepom, G.; Hamerman, J.A.; Greenbaum, C. Short-term IL-1beta blockade reduces monocyte CD11B integrin expression in an IL-8 dependent fashion in patients with type 1 diabetes. *Clin. Immunol.*, **2010**, *136*(2), 170-173.
- [63] Rabinovitch, A.; Suarez-Pinzon, W.L. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem. Pharmacol.*, **1998**, *55*(8), 1139-1149.
- [64] Dunn, A.J. Mechanisms by which cytokines signal the brain. *Int. Rev. Neurobiol.*, **2002**, *52*, 43-65.
- [65] Karlsson Faresjo, M.G.E.; Emerudh, J.; Ludvigsson, J. Cytokine profile in children during the first 3 months after the diagnosis of type 1 diabetes. *Scand. J. Immunol.*, **2004**, *59*(5), 517-526.
- [66] Atkinson, M.A.; Eisenbarth, G.S.; Michels, A.W. Type 1 diabetes. *Lancet*, **2014**, *383*(9911), 69-82.
- [67] Durinovic-Bello, I. Autoimmune diabetes: The role of t cells, mhc molecules and autoantigens. *Autoimmunity*, **1998**, *27*(3), 159-177.
- [68] Kristiansen, O.P.; Mandrup-Poulsen, T. Interleukin-6 and diabetes: The good, the bad, or the indifferent? *Diabetes*, **2005**, *54* Suppl 2, S114-124.
- [69] Campbell, I.L.; Kay, T.W.; Oxbrow, L.; Harrison, L.C. Essential role for interferon-gamma and interleukin-6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in nod/wehi mice. *J. Clin. Invest.*, **1991**, *87*(2), 739-742.
- [70] Chen, Y.M.; Chen, H.H.; Lai, K.L.; Hung, W.T.; Lan, J.L.; Chen, D.Y. The effects of rituximab therapy on released interferon- levels in the quantiferon assay among ra patients with different status of mycobacterium tuberculosis infection. *Rheumatology*, **2013**, *52*(4), 697-704.
- [71] Barr, T.A.; Shen, P.; Brown, S.; Lampropoulou, V.; Roch, T.; Lawrie, S.; Fan, B.; O'Connor, R.A.; Anderton, S.M.; Bar-Or, A.; Fillatreau, S.; Gray, D. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing b cells. *J Exp Med.*, **2012**, *209*(5), 1001-1010.
- [72] Monson, N.L.; Cravens, P.; Hussain, R.; Harp, C.T.; Cummings, M.; de Pilar Martin, M.; Ben, L.H.; Do, J.; Lyons, J.A.; Lovette-Racke, A.; Stüve, O.; Shlomchik, M.; Eagar, T.N. Rituximab therapy reduces organ-specific t cell responses and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS ONE*, **2011**, *6*(2), e17103.
- [73] Russell, M.A.; Morgan, N.G. The impact of anti-inflammatory cytokines on the pancreatic  $\beta$ -cell. *Islets*, **2014**, *6*(3), e950547.
- [74] Xiong, X.; Barreto, G.E.; Xu, L.; Ouyang, Y.B.; Xie, X.; Giffard, R.G. Increased brain injury and worsened neurological outcome in interleukin-4 knockout mice after transient focal cerebral ischemia. *Stroke*, **2011**, *42*(7), 2026-2032.
- [75] Colotta, F.; Re, F.; Muzio, M.; Bertini, R.; Polentarutti, N.; Sironi, M.; Giri, J.G.; Dower, S.K.; Sims, J.E.; Mantovani, A. Interleukin-1 type ii receptor: A decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science*, **1993**, *261*(5120), 472-475.
- [76] Byrne, A.; Reen, D.J. Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J. Immunol.*, **2002**, *168*(4), 1968-1977.
- [77] Oishi, S.; Takano, R.; Tamura, S.; Tani, S.; Iwaizumi, M.; Hamaya, Y.; Takagaki, K.; Nagata, T.; Seto, S.; Horii, T.; Osawa, S.; Furuta, T.; Miyajima, H.; Sugimoto, K. M2 polarization of murine peritoneal macrophages induces regulatory cytokine production and suppresses t-cell proliferation. *Immunology*, **2016**, *149*(3), 320-328.
- [78] Sabat, R.; Grütz, G.; Warszawska, K.; Kirsch, S.; Witte, E.; Wolk, K.; Geginat, J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **2010**, *21*(5), 331-344.
- [79] Cope, A.; Le Fric, G.; Cardone, J.; Kemper, C. The Th1 life cycle: molecular control of IFN- $\gamma$  to IL-10 switching. *Trends Immunol.*, **2011**, *32*(6), 278-286.
- [80] de Waal Malefyt, R.; Abrams, J.; Bennett, B.; Figdor, C. G.; de Vries, J. E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.*, **1991**, *174*(5), 1209-1220.
- [81] Oswald, I.P.; Wynn, T.A.; Sher, A.; James, S.L. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1992**, *89*(18), 8676-8680.
- [82] Shalev, I.; Schmelzle, M.; Robson, S.C.; Levy, G. Making sense of regulatory t cell suppressive function. *Semin. Immunol.*, **2011**, *23*(4), 282-292.
- [83] Gallo, P.; Gonçalves, R.; Mosser, D.M. The influence of IgG density and macrophage Fc (Gamma) receptor cross-linking on phagocytosis and IL-10 production. *Immunol. Lett.*, **2010**, *133*(2), 70-77.
- [84] Vogelpoel, L.T.C.; Baeten, D.L.P.; de Jong, E.C.; den Dunnen, J. Control of cytokine production by human Fc gamma receptors: Implications for pathogen defense and autoimmunity. *Front. Immunol.*, **2015**, *6*.
- [85] Boruchov, A.M.; Heller, G.; Veri, M.C.; Bonvini, E.; Ravetch, J.V.; Young, J.W. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human dcs mediate opposing functions. *J. Clin. Invest.*, **2005**, *115*(10), 2914-2923.
- [86] Delamaire, M.; Maugendre, D.; Moreno, M.; Le Goff, M.C.; Allainic, H.; Genetet, B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet. Med.*, **1997**, *14*(1), 29-34.
- [87] Wilson, R.M.; Reeves, W.G. Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes. *Clin. Exp. Immunol.*, **1986**, *63*(2), 478-484.
- [88] Geerlings, S.E.; Hoepelman, A.I. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (dm). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **1999**, *26*(3-4), 259-265.
- [89] Church, A.K.; VanDerMeid, K.R.; Baig, N.A.; Baran, A.M.; Witzig, T.E.; Nowakowski, G.S.; Zent, C.S. Anti-CD20 monoclonal antibody-dependent phagocytosis of chronic lymphocytic leukaemia cells by autologous macrophages. *Clin. Exp. Immunol.*, **2016**, *183*(1), 90-101.
- [90] Chao, M.P.; Alizadeh, A.A.; Tang, C.; Myklebust, J.H.; Varghese, B.; Gill, S.; Jan, M.; Cha, A.C.; Chan, C.K.; Tan, B.T.; Park, C.Y.; Zhao, F.; Kohrt, H.E.; Malumbres, R.; Briones, J.; Gascoyne, R.D.; Lossos, I.S.; Levy, R.; Weissman, I.L.; Majeti, R. Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-hodgkin lymphoma. *Cell*, **2010**, *142*(5), 699-713.
- [91] Burd, J.F.; Usategui-Gomez, M. A colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase. *Clin. Chim. Acta.*, **1973**, *46*(3), 223-227.
- [92] Smith, S.M.; Wunder, M.B.; Norris, D.A.; Shellman, Y.G. A simple protocol for using a ldh-based cytotoxicity assay to assess the effects of death and growth inhibition at the same time. *PLoS ONE*, **2011**, *6*(11), e26908.

# Chapitre 3

## Conclusions et perspectives

## Chapitre 3

### Conclusions et perspectives

Le diabète de type 1 est devenu un problème majeur de santé publique au cours de ces dernières décennies. C'est une maladie auto-immune, multifactorielle survenant sur un terrain de susceptibilité génétique et environnementale. Elle est caractérisée par une forte carence dans la production de l'insuline résultant de la destruction sélective et progressive des cellules  $\beta$  du pancréas par les cellules mononucléées telles que les monocytes. Ces derniers sont nécessaires au développement d'une réaction auto-immune et l'activation des cellules cytotoxiques capables de détruire les cellules  $\beta$  du pancréas par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et une augmentation du burst oxydatif. Leurs fonctions pourraient être affectées par différents médiateurs ou molécules exogènes, utilisés dans le cadre de thérapies ciblées.

Le Rituximab, anticorps monoclonal chimérique anti-CD20, représente un espoir thérapeutique dans la gestion et le traitement de plusieurs maladies auto-immunes y compris le DT1. Il cible principalement les cellules B présentatrices d'antigène par différents mécanismes assurés principalement par les monocytes qui sont les cellules effectrices dominantes pendant l'immunothérapie avec le Rituximab.

Au cours de ce travail de thèse que nous avons mené, nous nous sommes intéressés à l'étude *ex vivo* de l'effet du Rituximab, sur l'immunomodulation de l'activité proinflammatoire des cellules mononucléées, plus précisément les monocytes, par le dosage de leur production de médiateurs proinflammatoires au début du DT1 tels que les cytokines et le NO.

À notre connaissance, il s'agit de la première étude explorant le rôle du RTX sur la modulation de la production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes au cours du DT1 d'apparition récente. Nos résultats ont démontré pour la première fois que le RTX peut moduler de façon différentielle les activités fonctionnelles anormales des monocytes et l'activation des voies pro-inflammatoires, au cours du DT1 d'apparition récente. En effet, le traitement par le RTX a nettement diminué la production d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6,  $_{if}Ca^{2+}$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et légèrement régulé la production d'IFN- $\gamma$ , la cytotoxicité basée sur la LDH, la production de NO, l'activité des NOS et le rapport activité des NOS-activité de l'arginase.

D'un autre côté, le RTX peut également favoriser la production de cytokines anti-inflammatoires et régulatrices par les MO au début de la maladie. En effet, le traitement par le RTX a significativement augmenté la production d'IL-4, d'IL-10, ainsi que les activités d'arginase et de la catalase. De plus, le RTX a légèrement augmenté la phagocytose et les capacités de destruction des agents pathogènes dans les monocytes des patients atteints de DT1.

Néanmoins, il serait très intéressant de vérifier mécaniquement l'effet du RTX sur d'autres voies de signalisation impliquées dans la polarisation des monocytes et d'autres groupes de médiateurs solubles sécrétés par les monocytes. En effet, l'évaluation d'autres cytokines apporterait d'autres éléments très importants pour la compréhension du mode d'action du RTX sur les acteurs cellulaires et moléculaires de la réponse immunitaire à médiation cellulaire ou humorale lors du déclenchement du DT1.

De plus, l'évaluation clinique sera toujours nécessaire pour déterminer l'impact *in vivo* du RTX chez les patients prédiabétiques et ceux nouvellement diagnostiqués afin d'immunomoduler l'immunité innée et de permuter l'activation des voies pro-inflammatoires.

En outre, pour élargir la fonction phagocytaire, nous proposons d'explorer de nouvelles études évaluant les effets du RTX sur les monocytes, à la fois en présence et en absence de complément et d'autres protéines opsoniques circulantes telles que l'anticorps anti-CD47.

D'un point de vue moléculaire, il serait intéressant d'étudier le polymorphisme existant sur les récepteurs FcγR (notamment le récepteur FcγRIIIa) des monocytes qui jouent un rôle dans l'affinité pour l'IgG1 humaine et augmente ainsi l'efficacité de l'ADCC.

# Chapitre 4

## Bibliographie

# Chapitre 4

## Bibliographie

Achenbach, P., Warncke, K., Reiter, J., Naserke, H.E., Williams, A.J.K., Bingley, P.J., Bonifacio, E., Ziegler, A.-G., 2004. Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. *Diabetes* 53, 384–392.

Aderem, A., Ulevitch, R.J., 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782–787. <https://doi.org/10.1038/35021228>

Aderem, A., Underhill, D.M., 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593–623. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>

Aebi, H., 1974. Catalase, in: *Methods of Enzymatic Analysis*. Elsevier, pp. 673–684. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50032-3>

Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A., 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 74, 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2007.02.002>

Aggarwal, B.B., Natarajan, K., 1996. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur. Cytokine Netw.* 7, 93–124.

Ainscough, J.S., Gerberick, G.F., Kimber, I., Dearman, R.J., 2015. Interleukin-1 $\beta$  Processing Is Dependent on a Calcium-mediated Interaction with Calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* 290, 31151–31161. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680694>

Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593–615.

Allione, A., Bernabei, P., Bosticardo, M., Ariotti, S., Forni, G., Novelli, F., 1999. Nitric Oxide Suppresses Human T Lymphocyte Proliferation Through IFN- $\gamma$ -Dependent and IFN- $\gamma$ -Independent Induction of Apoptosis. *The Journal of Immunology* 163, 4182–4191.

Ambarus, C.A., Krausz, S., van Eijk, M., Hamann, J., Radstake, T.R.D.J., Reedquist, K.A., Tak, P.P., Baeten, D.L.P., 2012. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J. Immunol. Methods* 375, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.10.013>

Andalib, A., Doulabi, H., Najafi, M., Tazhibi, M., Rezaie, A., 2011. Expression of chemokine receptors on Th1/Th2 CD4<sup>+</sup> lymphocytes in patients with multiple sclerosis. *Iran J Immunol* 8, 1–10. <https://doi.org/IJIV8i1A1>



- Anderson, M.S., Bluestone, J.A., 2005. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 447–485. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115643>
- Andre, C., 2008. Etude du rôle des cytokines dans l'activation de l'indoléamine 2,3-dioxygénase cérébrale impliquée dans les altérations comportementales associées à l'inflammation (phd). Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- Anolik, J.H., Campbell, D., Felgar, R.E., Young, F., Sanz, I., Rosenblatt, J., Looney, R.J., 2003. The relationship of FcγRIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 48, 455–459. <https://doi.org/10.1002/art.10764>
- Arafa, R.M., Desouky, S.M., Emam, S.M., Abed, N.T., Mohamed, S.Y., 2015. Detection of Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen-4 Gene Polymorphism in Type 1 Diabetes Mellitus. *Egypt J Immunol* 22, 49–57.
- Arango Duque, G., Descoteaux, A., 2014. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* 5, 491. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>
- Aribi, M., 2011. Autoimmunity and Immunotherapy of Type 1 Diabetes, in: Wagner, D. (Ed.), *Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy*. InTech. <https://doi.org/10.5772/20674>
- Aribi, M., Meziane, W., Habi, S., Boulatika, Y., Marchandin, H., Aymeric, J.-L., 2015. Macrophage Bactericidal Activities against *Staphylococcus aureus* Are Enhanced In Vivo by Selenium Supplementation in a Dose-Dependent Manner. *PLOS ONE* 10, e0135515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135515>
- Aribi, M., Moulessehoul, S., Kendouci-Tani, M., Benabadji, A.-B., Hichami, A., Khan, N.A., 2007. Relationship between interleukin-1β and lipids in type 1 diabetic patients. *Medical Science Monitor* 13, CR372–CR378.
- Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S., Michels, A.W., 2014. Type 1 diabetes. *Lancet* 383, 69–82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7)
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., Geissmann, F., 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, 666–670. <https://doi.org/10.1126/science.1142883>
- Auffray, C., Sieweke, M.H., Geissmann, F., 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 669–692. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>
- Azar, S.T., Tamim, H., Beyhum, H.N., Habbal, M.Z., Almawi, W.Y., 1999. Type I (Insulin-Dependent) Diabetes Is a Th1- and Th2-Mediated Autoimmune Disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 6, 306–310.

- Baker, P.R.S., Schopfer, F.J., O'Donnell, V.B., Freeman, B.A., 2009. Convergence of Nitric Oxide and Lipid Signaling: Anti-Inflammatory Nitro-Fatty Acids. *Free Radic Biol Med* 46, 989–1003. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.021>
- Bellosillo, B., Villamor, N., López-Guillermo, A., Marcé, S., Esteve, J., Campo, E., Colomer, D., Montserrat, E., 2001. Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood* 98, 2771–2777. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.9.2771>
- Bendtsen, K., Mandrup-Poulsen, T., Nerup, J., Nielsen, J.H., Dinarello, C.A., Svenson, M., 1986. Cytotoxicity of human pI 7 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science* 232, 1545–1547.
- Benghalem, I., Meziane, W., Hadjidj, Z., Ysmail-Dahlouk, L., Belamri, A., Mouhadjer, K., Aribi, M., 2017. High-density lipoprotein immunomodulates the functional activities of macrophage and cytokines produced during ex vivo macrophage-CD4 + T cell crosstalk at the recent-onset human type 1 diabetes. *Cytokine* 96, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.03.001>
- Benoit, M., Desnues, B., Mege, J.-L., 2008. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *The Journal of Immunology* 181, 3733–3739. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.3733>
- Beum, P.V., Kennedy, A.D., Williams, M.E., Lindorfer, M.A., Taylor, R.P., 2006. The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes. *J. Immunol.* 176, 2600–2609.
- Bhalla, A.K., Amento, E.P., Clemens, T.L., Holick, M.F., Krane, S.M., 1983. Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57, 1308–1310. <https://doi.org/10.1210/jcem-57-6-1308>
- Bingley, P.J., Bonifacio, E., Williams, A.J., Genovese, S., Bottazzo, G.F., Gale, E.A., 1997. Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes* 46, 1701–1710.
- Bluestone, J.A., Herold, K., Eisenbarth, G., 2010. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 464, 1293–1300.
- Bogdan, C., 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2, 907–916. <https://doi.org/10.1038/ni1001-907>
- Bogdan, C., Nathan, C., 1993. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 685, 713–739.
- Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A., Sinigaglia, F., 1998. Differential expression of

chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* 187, 129–134.

Bonifacio, E., Lampasona, V., J Bingley, P., 1998. IA-2 (Islet Cell Antigen 512) Is the Primary Target of Humoral Autoimmunity Against Type 1 Diabetes-Associated Tyrosine Phosphatase Autoantigens<sup>1</sup>. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161, 2648–54.

Boruchov, A.M., Heller, G., Veri, M.-C., Bonvini, E., Ravetch, J.V., Young, J.W., 2005. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J. Clin. Invest.* 115, 2914–2923. <https://doi.org/10.1172/JCI24772>

Bosly, A., 2006. Anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab) dans les maladies hématologiques et les affections auto-immunes. *Réanimation* 15, 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2006.06.015>

Bosque, F., Belkaid, Y., Briend, E., Hevin, B., Lebastard, M., Soussi, N., Milon, G., 1997. The biology of macrophages. *Pathol. Biol.* 45, 103–109.

Bottazzo, G.F., Florin-Christensen, A., Doniach, D., 1974. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 2, 1279–1283.

Bour-Jordan, H., Bluestone, J.A., 2007. B cell depletion: a novel therapy for autoimmune diabetes? *J Clin Invest* 117, 3642–3645. <https://doi.org/10.1172/JCI34236>

Bradshaw, E.M., Raddassi, K., Elyaman, W., Orban, T., Gottlieb, P.A., Kent, S.C., Hafler, D.A., 2009. Monocytes from Patients with Type 1 Diabetes Spontaneously Secrete Proinflammatory Cytokines Inducing Th17 Cells. *The Journal of Immunology* 183, 4432–4439. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900576>

Bretón-Romero, R., Lamas, S., 2014. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biology* 2, 529–534. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.02.005>

Brodie, G.M., Wallberg, M., Santamaria, P., Wong, F.S., Green, E.A., 2008. B-cells promote intra-islet CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-cell survival to enhance type 1 diabetes. *Diabetes* 57, 909–917. <https://doi.org/10.2337/db07-1256>

Brown, D.G. and Gordon, S. (2002) Phagocytes and anti-infective immunity. In Kaufmann, S.H.E., Sher, A. and Ahmed, R. (eds.), *Immunology of Infectious Diseases*. ASM Press, Washington, D.C., pp. 79-91.

Brunda, M.J., 1994. Interleukin-12. *J. Leukoc. Biol.* 55, 280–288.

Brüne, B., Dehne, N., Grossmann, N., Jung, M., Namgaladze, D., Schmid, T., von Knethen, A., Weigert, A., 2013. Redox Control of Inflammation in Macrophages. *Antioxid Redox Signal* 19, 595–637. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4785>

Bubien, J.K., Zhou, L.J., Bell, P.D., Frizzell, R.A., Tedder, T.F., 1993. Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca<sup>2+</sup> conductance found constitutively in B lymphocytes. *J. Cell Biol.* 121, 1121–1132.

- Burd, J.F., Usategui-Gomez, M., 1973. A colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase. *Clin. Chim. Acta* 46, 223–227.
- Byrd, J.C., Kitada, S., Flinn, I.W., Aron, J.L., Pearson, M., Lucas, D., Reed, J.C., 2002. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood* 99, 1038–1043. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.3.1038>
- Cabrera-Fuentes, H.A., Lopez, M.L., McCurdy, S., Fischer, S., Meiler, S., Baumer, Y., Galuska, S.P., Preissner, K.T., Boisvert, W.A., 2015. Regulation of monocyte/macrophage polarisation by extracellular RNA. *Thromb. Haemost.* 113, 473–481. <https://doi.org/10.1160/TH14-06-0507>
- Calabrese, L.H., Rose-John, S., 2014. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* 10, 720–727. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.127>
- Campbell, I.L., Kay, T.W., Oxbrow, L., Harrison, L.C., 1991. Essential role for interferon-gamma and interleukin-6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD/Wehi mice. *J. Clin. Invest.* 87, 739–742. <https://doi.org/10.1172/JCI115055>
- Carroll, M.C., 1998. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 545–568. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.545>
- Carter, P., 2001. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* 1, 118–129. <https://doi.org/10.1038/35101072>
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., Watier, H., 2002. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99, 754–758. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.3.754>
- Cartron, G., Watier, H., Golay, J., Solal-Celigny, P., 2004. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 104, 2635–2642. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1110>
- Catroux, M., Lauda-Maillen, M., Pathe, M., De Boisgrollier de Ruolz, A.-C., Cazenave-Roblot, F., Roblot, P., Souchaud-Debouverie, O., 2017. Événements infectieux survenus au cours des maladies auto-immunes traitées par rituximab : à partir d’une étude rétrospective de 93 cas. *La Revue de Médecine Interne* 38, 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2016.09.010>
- Cenci, E., Romani, L., Mencacci, A., Spaccapelo, R., Schiaffella, E., Puccetti, P., Bistoni, F., 1993. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. *Eur. J. Immunol.* 23, 1034–1038. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230508>

- Chadban, S.J., Tesch, G.H., Foti, R., Lan, H.Y., Atkins, R.C., Nikolic-Paterson, D.J., 1998. Interleukin-10 differentially modulates MHC class II expression by mesangial cells and macrophages in vitro and in vivo. *Immunology* 94, 72–78.
- Chao, M.P., Alizadeh, A.A., Tang, C., Myklebust, J.H., Varghese, B., Gill, S., Jan, M., Cha, A.C., Chan, C.K., Tan, B.T., Park, C.Y., Zhao, F., Kohrt, H.E., Malumbres, R., Briones, J., Gascoyne, R.D., Lossos, I.S., Levy, R., Weissman, I.L., Majeti, R., 2010. Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell* 142, 699–713. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.044>
- Chieppa, M., Bianchi, G., Doni, A., Del Prete, A., Sironi, M., Laskarin, G., Monti, P., Piemonti, L., Biondi, A., Mantovani, A., Introna, M., Allavena, P., 2003. Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *J. Immunol.* 171, 4552–4560.
- Church, A.K., VanDerMeid, K.R., Baig, N.A., Baran, A.M., Witzig, T.E., Nowakowski, G.S., Zent, C.S., 2016. Anti-CD20 monoclonal antibody-dependent phagocytosis of chronic lymphocytic leukaemia cells by autologous macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 183, 90–101. <https://doi.org/10.1111/cei.12697>
- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., Ravetch, J.V., 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* 6, 443–446. <https://doi.org/10.1038/74704>
- Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarutti, N., Sironi, M., Giri, J.G., Dower, S.K., Sims, J.E., Mantovani, A., 1993. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261, 472–475.
- Comerford, I., McColl, S.R., 2011. Mini-review series: focus on chemokines. *Immunol. Cell Biol.* 89, 183–184. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.164>
- Côrte-Real, J., Duarte, N., Tavares, L., Penha-Gonçalves, C., 2009. Autoimmunity triggers in the NOD mouse: a role for natural auto-antibody reactivities in type 1 diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1173, 442–448. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04661.x>
- Cragg, M.S., Glennie, M.J., 2004. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood* 103, 2738–2743. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-2031>
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J.-P., D’Cruz, D., Casanova, J.-L., Trouillet, C., Geissmann, F., 2010. Human CD14<sup>dim</sup> monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33, 375–386. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.012>
- Cudworth, A.G., Woodrow, J.C., 1975. Evidence for HL-A-linked genes in “juvenile” diabetes mellitus. *Br Med J* 3, 133–135.

- Cunningham, J.M., Mabley, J.G., Green, I.C., 1997. Interleukin 1beta-mediated inhibition of arginase in RINm5F cells. *Cytokine* 9, 570–576. <https://doi.org/10.1006/cyto.1996.0203>
- Curtsinger, J.M., Schmidt, C.S., Mondino, A., Lins, D.C., Kedl, R.M., Jenkins, M.K., Mescher, M.F., 1999. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol.* 162, 3256–3262.
- Dahlén, E., Dawe, K., Ohlsson, L., Hedlund, G., 1998. Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF-alpha in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *J. Immunol.* 160, 3585–3593.
- Danescu, L.G., Levy, S., Levy, J., 2009. Vitamin D and diabetes mellitus. *Endocrine* 35, 11–17. <https://doi.org/10.1007/s12020-008-9115-5>
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., de Vries, J.E., 1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174, 1209–1220.
- Delamaire, M., Maugeudre, D., Moreno, M., Le Goff, M.C., Allannic, H., Genetet, B., 1997. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet. Med.* 14, 29–34. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9136\(199701\)14:1<29::AID-DIA300>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9136(199701)14:1<29::AID-DIA300>3.0.CO;2-V)
- Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G., Griffiths, G., 1994. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J. Cell Biol.* 124, 677–688.
- Diem, K., Magaret, A., Klock, A., Jin, L., Zhu, J., Corey, L., 2015. Image analysis for accurately counting CD4+ and CD8+ T cells in human tissue. *J. Virol. Methods* 222, 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.06.004>
- Drapier, J.C., 1997. [Nitric oxide and macrophages]. *Pathol. Biol.* 45, 110–114.
- Dubois-Laforgue, D., 2007. Étiologie et physiopathologie du diabète de type 1. *EMC - Endocrinologie - Nutrition* 4, 1–18. [https://doi.org/10.1016/S1155-1941\(07\)46585-4](https://doi.org/10.1016/S1155-1941(07)46585-4)
- Ducrocq, C., Servy, C., Cudic, M., Blanchard, B., 2001. Intervention du monoxyde d’azote, NO, et de ses dérivés oxydés, particulièrement chez les mammifères. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 79, 95–102. <https://doi.org/10.1139/y00-077>
- Dugas, N., Palacios-Calender, M., Dugas, B., Riveros-Moreno, V., Delfraissy, J.F., Kolb, J.P., Moncada, S., 1998. Regulation by endogenous INTERLEUKIN-10 of the expression of nitric oxide synthase induced after ligation of CD23 in human macrophages. *Cytokine* 10, 680–689. <https://doi.org/10.1006/cyto.1998.0352>
- Durante, W., Johnson, F.K., Johnson, R.A., 2007. ARGINASE: A CRITICAL REGULATOR OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS AND VASCULAR FUNCTION. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34, 906–911. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04638.x>

- Durinovic-Bello, I., 1998. Autoimmune Diabetes: The Role of T Cells, MHC Molecules and Autoantigens. *Autoimmunity* 27, 159–177. <https://doi.org/10.3109/08916939809003864>
- Elfving, M., Svensson, J., Oikarinen, S., Jonsson, B., Olofsson, P., Sundkvist, G., Lindberg, B., Lernmark, A., Hyöty, H., Ivarsson, S.-A., 2008. Maternal enterovirus infection during pregnancy as a risk factor in offspring diagnosed with type 1 diabetes between 15 and 30 years of age. *Exp Diabetes Res* 2008, 271958. <https://doi.org/10.1155/2008/271958>
- El-Gayar, S., Thüring-Nahler, H., Pfeilschifter, J., Röllinghoff, M., Bogdan, C., 2003. Translational control of inducible nitric oxide synthase by IL-13 and arginine availability in inflammatory macrophages. *J. Immunol.* 171, 4561–4568.
- Elliott, T.G., Cockcroft, J.R., Groop, P.H., Viberti, G.C., Ritter, J.M., 1993. Inhibition of nitric oxide synthesis in forearm vasculature of insulin-dependent diabetic patients: blunted vasoconstriction in patients with microalbuminuria. *Clin. Sci.* 85, 687–693.
- Erlich, H., Valdes, A.M., Noble, J., Carlson, J.A., Varney, M., Concannon, P., Mychaleckyj, J.C., Todd, J.A., Bonella, P., Fear, A.L., Lavant, E., Louey, A., Moonsamy, P., Type 1 Diabetes Genetics Consortium, 2008. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes* 57, 1084–1092. <https://doi.org/10.2337/db07-1331>
- Espinoza-Jiménez, A., Peón, A.N., Terrazas, L.I., 2012. Alternatively Activated Macrophages in Types 1 and 2 Diabetes. *Mediators of Inflammation* 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/815953>
- Ezra, N., Ochoa, M.T., Craft, N., 2010. Human Immunodeficiency Virus and Leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2, 248–257. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.68528>
- Falcone, M., Lee, J., Patstone, G., Yeung, B., Sarvetnick, N., 1998. B Lymphocytes Are Crucial Antigen-Presenting Cells in the Pathogenic Autoimmune Response to GAD65 Antigen in Nonobese Diabetic Mice. *The Journal of Immunology* 161, 1163–1168.
- Farag, S.S., Flinn, I.W., Modali, R., Lehman, T.A., Young, D., Byrd, J.C., 2004. Fc gamma RIIIa and Fc gamma RIIa polymorphisms do not predict response to rituximab in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 103, 1472–1474. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2548>
- Fialkow, L., Wang, Y., Downey, G.P., 2007. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.030>
- Förstermann, U., Sessa, W.C., 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33, 829–837, 837a-837d. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- Franc, N.C., Dimarcq, J.L., Lagueux, M., Hoffmann, J., Ezekowitz, R.A., 1996. Croquemort, a novel Drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* 4, 431–443.

- Gabbay, M.A.L., Sato, M.N., Duarte, A.J.S., Dib, S.A., 2012. Serum titres of anti-glutamic acid decarboxylase-65 and anti-IA-2 autoantibodies are associated with different immunoregulatory milieu in newly diagnosed type 1 diabetes patients. *Clin. Exp. Immunol.* 168, 60–67. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04538.x>
- Gahmberg, C.G., Valmu, L., Fagerholm, S., Kotovuori, P., Ihanus, E., Tian, L., Pessa-Morikawa, T., 1998. Leukocyte integrins and inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 549–555. <https://doi.org/10.1007/s000180050183>
- Galès, A., 2009. Rôle central des Monocytes/Macrophages dans la défense anti-infectieuse ; implication de la polarisation M2 et des marqueurs associés Dectine-1, Récepteur Mannose et Interleukine-10 (phd). Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- Gallo, P., Gonçalves, R., Mosser, D.M., 2010. The influence of IgG density and macrophage Fc (gamma) receptor cross-linking on phagocytosis and IL-10 production. *Immunol. Lett.* 133, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.07.004>
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., n.d. Espèces réactives de l’oxygène 6.
- Geenen, V., Brilot, F., Louis, C., Hansenne, I., Renard, C., Martens, H., 2005. [Importance of a thymus dysfunction in the pathophysiology of type 1 diabetes]. *Rev Med Liege* 60, 291–296.
- Geerlings, S.E., Hoepelman, A.I., 1999. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 26, 259–265. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01397.x>
- Geissmann, F., Auffray, C., Palframan, R., Wirrig, C., Ciocca, A., Campisi, L., Narni-Mancinelli, E., Lauvau, G., 2008. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol. Cell Biol.* 86, 398–408. <https://doi.org/10.1038/icb.2008.19>
- Geissmann, F., Jung, S., Littman, D.R., 2003. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* 19, 71–82. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00174-2)
- Gitelman, H.J., 1967. An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Analytical Biochemistry* 18, 521–531. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(67\)90110-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(67)90110-8)
- Giugliano, D., Ceriello, A., Paolisso, G., 1996. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19, 257–267.
- Golay, J., Lazzari, M., Facchinetti, V., Bernasconi, S., Borleri, G., Barbui, T., Rambaldi, A., Introna, M., 2001. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* 98, 3383–3389.



- Goldberg, E., Krause, I., 2009. Infection and type 1 diabetes mellitus — A two edged sword? *Autoimmunity Reviews* 8, 682–686. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.02.017>
- Gordon, S., Taylor, P.R., 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953–964. <https://doi.org/10.1038/nri1733>
- Gosselin M, Ph. D., psychologue. (Printemps 2000). *Le stress au détour du chemin*, Plein Soleil, Diabète Québec, p.25
- Green, E.A., Flavell, R.A., 1999. Tumor necrosis factor-alpha and the progression of diabetes in non-obese diabetic mice. *Immunol. Rev.* 169, 11–22.
- Guevara, I., Iwanejko, J., Dembińska-Kieć, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., Gołbek, I., Bartuś, S., Malczewska-Malec, M., Szczudlik, A., 1998. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clinica Chimica Acta* 274, 177–188. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(98\)00060-6](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(98)00060-6)
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. *Free radicals in biology and medicine*, Fifth edition. ed. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Hatjiharissi, E., Xu, L., Santos, D.D., Hunter, Z.R., Ciccarelli, B.T., Verselis, S., Modica, M., Cao, Y., Manning, R.J., Leleu, X., Dimmock, E.A., Kortsaris, A., Mitsiades, C., Anderson, K.C., Fox, E.A., Treon, S.P., 2007. Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the Fc{gamma}RIIIa-158 V/V and V/F polymorphism. *Blood* 110, 2561–2564. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-070656>
- Haviarová, Z., Janegová, A., Janega, P., Durdík, Š., Kováč, P., Štvrtinová, V., Mráz, P., 2011. Expression of Constitutive Nitric Oxide Synthase Isoforms in Varicose Vein Wall; Preliminary Results. *Int J Vasc Med* 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/204723>
- Herold, K.C., Usmani-Brown, S., Ghazi, T., Lebastchi, J., Beam, C.A., Bellin, M.D., Ledizet, M., Sosenko, J.M., Krischer, J.P., Palmer, J.P., 2015.  $\beta$  Cell death and dysfunction during type 1 diabetes development in at-risk individuals. *Journal of Clinical Investigation* 125, 1163–1173. <https://doi.org/10.1172/JCI78142>
- Hey, C., Boucher, J.L., Vadon-Le Goff, S., Ketterer, G., Wessler, I., Racké, K., 1997. Inhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by N omega-hydroxy-D,L-indospicine, effects on L-arginine utilization by nitric oxide synthase. *Br. J. Pharmacol.* 121, 395–400. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701143>
- Hobbs, C.A., Gilmour, S.K., n.d. High levels of intracellular polyamines promote histone acetyltransferase activity resulting in chromatin hyperacetylation. *Journal of Cellular Biochemistry* 77, 345–360. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(20000601\)77:3<345::AID-JCB1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(20000601)77:3<345::AID-JCB1>3.0.CO;2-P)

- Horie, I., Kawasaki, E., Shimomura, A., Satoh, T., Ueki, I., Kuwahara, H., Ando, T., Abiru, N., Usa, T., Eguchi, K., 2010. Emergence of anti-islet autoantibodies in Japanese patients with type 1 diabetes. *Endocr. J.* 57, 623–628.
- Hristov, M., Weber, C., 2011. Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* 106, 757–762. <https://doi.org/10.1160/TH11-07-0500>
- Hu, C., Rodriguez-Pinto, D., Du, W., Ahuja, A., Henegariu, O., Wong, F.S., Shlomchik, M.J., Wen, L., 2007. Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *J Clin Invest* 117, 3857–3867. <https://doi.org/10.1172/JCI32405>
- Huang, Z., Luo, Q., Yao, F., Qing, C., Ye, J., Deng, Y., Li, J., 2016. Identification of Differentially Expressed Long Non-coding RNAs in Polarized Macrophages. *Scientific Reports* 6. <https://doi.org/10.1038/srep19705>
- Hyttinen, V., Kaprio, J., Kinnunen, L., Koskenvuo, M., Tuomilehto, J., 2003. Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. *Diabetes* 52, 1052–1055.
- Inman, L.R., McAllister, C.T., Chen, L., Hughes, S., Newgard, C.B., Kettman, J.R., Unger, R.H., Johnson, J.H., 1993. Autoantibodies to the GLUT-2 glucose transporter of beta cells in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 1281–1284.
- In't Veld, P., 2011. Insulinitis in human type 1 diabetes: The quest for an elusive lesion. *Islets* 3, 131–138.
- Isidro, R.A., Appleyard, C.B., 2016. Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 311, G59-73. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00123.2016>
- James, S.L., 1995. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol. Rev.* 59, 533–547.
- Janeway, C. (Ed.), 2001. *Immunobiology: the immune system in health and disease ; [animated CD-ROM inside]*, 5. ed. ed. Garland Publ. [u.a.], New York, NY.
- Jansen, A., Homo-Delarche, F., Hooijkaas, H., Leenen, P.J., Dardenne, M., Drexhage, H.A., 1994. Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes* 43, 667–675.
- Jaumouillé, V., Grinstein, S., 2011. Receptor mobility, the cytoskeleton, and particle binding during phagocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.10.006>
- Jianjun Yang, null, Zhang, R., Lu, G., Shen, Y., Peng, L., Zhu, C., Cui, M., Wang, W., Arnaboldi, P., Tang, M., Gupta, M., Qi, C.-F., Jayaraman, P., Zhu, H., Jiang, B., Chen, S., He, J.C., Ting, A.T., Zhou, M.-M., Kuchroo, V.K., Morse, H.C., Ozato, K., Sikora, A.G., Xiong,

- H., 2013. T cell–derived inducible nitric oxide synthase switches off Th17 cell differentiation. *J. Exp. Med.* 210, 1447–1462. <https://doi.org/10.1084/jem.20122494>
- Johnson, P., Glennie, M., 2003. The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells. *Seminars in Oncology* 30, 3–8. <https://doi.org/10.1053/sonc.2003.50025>
- Johnston, R.B., Kitagawa, S., 1985. Molecular basis for the enhanced respiratory burst of activated macrophages. *Fed. Proc.* 44, 2927–2932.
- Kahn, A., 1995. Le niveau d'expression du gène de l'insuline est-il relié à la susceptibilité au diabète de type 1 ? *médecine/sciences* 11, 1042. <https://doi.org/10.4267/10608/2408>
- Kahn A., généticien, interviewé par Futura Sciences, 2002. « Le diabète est héréditaire. » L'avenir n'est pas écrit.
- Kahn, A., Gisselbrecht, S., 2014. Histoire de la thérapie ciblée en cancérologie.
- Kaminitz, A., Stein, J., Yaniv, I., Askenasy, N., 2007. The vicious cycle of apoptotic  $\beta$  -cell death in type 1 diabetes. *Immunology and Cell Biology* 85, 582–589. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100093>
- Kaprio, J., Tuomilehto, J., Koskenvuo, M., Romanov, K., Reunanen, A., Eriksson, J., Stengård, J., Kesäniemi, Y.A., 1992. Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia* 35, 1060–1067.
- Karlsson Faresjo, M.G.E., Ernerudh, J., Ludvigsson, J., 2004. Cytokine Profile in Children During the First 3 Months after the Diagnosis of Type 1 Diabetes. *Scandinavian Journal of Immunology* 59, 517–526. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01420.x>
- Kasi, P.M., Tawbi, H.A., Oddis, C.V., Kulkarni, H.S., 2012. Clinical review: Serious adverse events associated with the use of rituximab - a critical care perspective. *Critical Care* 16, 231. <https://doi.org/10.1186/cc11304>
- Kennedy, D.W., Abkowitz, J.L., 1998. Mature monocytic cells enter tissues and engraft. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14944–14949.
- Kennedy, D.W., Abkowitz, J.L., 1997. Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model. *Blood* 90, 986–993.
- Kitamura, N., Nishinarita, S., Takizawa, T., Tomita, Y., Horie, T., 2000. Cultured human monocytes secrete fibronectin in response to activation by proinflammatory cytokines. *Clin Exp Immunol* 120, 66–70. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01162.x>
- Klein, J., Sato, A., 2000. The HLA system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 343, 702–709. <https://doi.org/10.1056/NEJM200009073431006>

- Klein, L., Kyewski, B., 2000. Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 179–186.
- Knerr, I., Wolf, J., Reinehr, T., Stachow, R., Grabert, M., Schober, E., Rascher, W., Holl, R.W., DPV Scientific Initiative of Germany and Austria, 2005. The “accelerator hypothesis”: relationship between weight, height, body mass index and age at diagnosis in a large cohort of 9,248 German and Austrian children with type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 48, 2501–2504. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-0033-2>
- Knip, M., Veijola, R., Virtanen, S.M., Hyöty, H., Vaarala, O., Akerblom, H.K., 2005. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes* 54 Suppl 2, S125-136.
- Ko, K.S., Lee, M., Koh, J.J., Kim, S.W., 2001. Combined Administration of Plasmids Encoding IL-4 and IL-10 Prevents the Development of Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *Molecular Therapy* 4, 313–316. <https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0459>
- Koene, H.R., Kleijer, M., Algra, J., Roos, D., von dem Borne, A.E., de Haas, M., 1997. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 90, 1109–1114.
- Kojo, S., Tsutsumi, A., Goto, D., Sumida, T., 2003. Low expression levels of soluble CD1d gene in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 30, 2524–2528.
- Kolb, H., Kolb-Bachofen, V., 1992. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunology Today* 13, 157–160. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(92\)90118-Q](https://doi.org/10.1016/0167-5699(92)90118-Q)
- Kristiansen, O.P., Mandrup-Poulsen, T., 2005. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes* 54 Suppl 2, S114-124.
- Lai, Y., Schneider, D., Kiszun, A., Hauck-Schmalenberger, I., Breier, G., Brandhorst, D., Brandhorst, H., Iken, M., Brendel, M.D., Bretzel, R.G., Linn, T., 2005. Vascular endothelial growth factor increases functional beta-cell mass by improvement of angiogenesis of isolated human and murine pancreatic islets. *Transplantation* 79, 1530–1536.
- Laverny, G., Penna, G., Vetrano, S., Correale, C., Nebuloni, M., Danese, S., Adorini, L., 2010. Efficacy of a potent and safe vitamin D receptor agonist for the treatment of inflammatory bowel disease. *Immunology Letters* 131, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.03.006>
- Lefer, D.J., Jones, S.P., Girod, W.G., Baines, A., Grisham, M.B., Cockrell, A.S., Huang, P.L., Scalia, R., 1999. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am. J. Physiol.* 276, H1943-1950.
- Lehuen, A., Diana, J., Zaccane, P., Cooke, A., 2010. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 501–513. <https://doi.org/10.1038/nri2787>

Lévy-Marchal, C., 2010. L'augmentation d'incidence du diabète de type 1 : la réalité du diabète de l'enfant ? /data/revues/19572557/00040003/326/.

Li, H., Meininger, C.J., Hawker, J.R., Haynes, T.E., Kepka-Lenhart, D., Mistry, S.K., Morris, S.M., Wu, G., 2001. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E75-82. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.1.E75>

Liaskou, E., Wilson, D.V., Oo, Y.H., 2012. Innate Immune Cells in Liver Inflammation [WWW Document]. *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1155/2012/949157>

Libby, P., Nahrendorf, M., Pittet, M.J., Swirski, F.K., 2008. Diversity of denizens of the atherosclerotic plaque: not all monocytes are created equal. *Circulation* 117, 3168–3170. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.783068>

Liew, F.Y., Li, Y., Moss, D., Parkinson, C., Rogers, M.V., Moncada, S., 1991. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 21, 3009–3014. <https://doi.org/10.1002/eji.1830211216>

Lijia, Z., Zhao, S., Wang, X., Wu, C., Yang, J., 2012. A self-propelling cycle mediated by reactive oxide species and nitric oxide exists in LPS-activated microglia. *Neurochem. Int.* 61, 1220–1230. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.09.002>

Lillioja, S., Mott, D.M., Spraul, M., Ferraro, R., Foley, J.E., Ravussin, E., Knowler, W.C., Bennett, P.H., Bogardus, C., 1993. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N. Engl. J. Med.* 329, 1988–1992. <https://doi.org/10.1056/NEJM199312303292703>

Lindahl, T., Karran, P., Wood, R.D., 1997. DNA excision repair pathways. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 158–169.

Liossis, S.-N.C., Sfikakis, P.P., 2008. Rituximab-induced B cell depletion in autoimmune diseases: Potential effects on T cells. *Clinical Immunology* 127, 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.01.011>

Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L., Goodnow, C.C., 2003. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat. Immunol.* 4, 350–354. <https://doi.org/10.1038/ni906>

Liu, X., Turban, S., Carter, R.N., Ahmad, S., Ramage, L., Webster, S.P., Walker, B.R., Seckl, J.R., Morton, N.M., 2014.  $\hat{I}^2$ -Cell-Specific Glucocorticoid Reactivation Attenuates Inflammatory  $\hat{I}^2$ -Cell Destruction. *Frontiers in Endocrinology* 5. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00165>

Lu, J., Li, Q., Xie, H., Chen, Z.J., Borovitskaya, A.E., Maclaren, N.K., Notkins, A.L., Lan, M.S., 1996. Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 2307–2311.

- Ludvigsson, J., 2009. Therapy with GAD in diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 25, 307–315. <https://doi.org/10.1002/dmrr.941>
- Luo, X., Herold, K.C., Miller, S.D., 2010. Immunotherapy of type 1 diabetes: where are we and where should we be going? *Immunity* 32, 488–499. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.04.002>
- Luppi, P., Alexander, A., Bertera, S., Noonan, K., Trucco, M., 1999. The same HLA-DQ alleles determine either susceptibility or resistance to different coxsackievirus-mediated autoimmune diseases. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 13, 14–26.
- Maarsingh, H., Zaagsma, J., Meurs, H., 2009. Arginase: a key enzyme in the pathophysiology of allergic asthma opening novel therapeutic perspectives: Arginase and allergic asthma. *British Journal of Pharmacology* 158, 652–664. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00374.x>
- MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C., 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323–350. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.323>
- Mahalingam, S., Karupiah, G., 1999. Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases. *Immunol. Cell Biol.* 77, 469–475. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1999.00858.x>
- Manches, O., Lui, G., Chaperot, L., Gressin, R., Molens, J.-P., Jacob, M.-C., Sotto, J.-J., Leroux, D., Bensa, J.-C., Plumas, J., 2003. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101, 949–954. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0469>
- Mandrup-Poulsen, T., Pickersgill, L., Donath, M.Y., 2010. Blockade of interleukin 1 in type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 6, 158–166. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.271>
- Mantegazza, A.R., Magalhaes, J.G., Amigorena, S., Marks, M.S., 2013. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic* 14, 135–152. <https://doi.org/10.1111/tra.12026>
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004a. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004b. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- Mariño, E., Villanueva, J., Walters, S., Liuwantara, D., Mackay, F., Grey, S.T., 2009. CD4+CD25+ T-Cells Control Autoimmunity in the Absence of B-Cells. *Diabetes* 58, 1568–1577. <https://doi.org/10.2337/db08-1504>
- Martin, A.P., Rankin, S., Pitchford, S., Charo, I.F., Furtado, G.C., Lira, S.A., 2008. Increased expression of CCL2 in insulin-producing cells of transgenic mice promotes mobilization of

- myeloid cells from the bone marrow, marked insulinitis, and diabetes. *Diabetes* 57, 3025–3033. <https://doi.org/10.2337/db08-0625>
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M., 2008. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 13, 453–461.
- Martinez-Pomares, L., Reid, D.M., Brown, G.D., Taylor, P.R., Stillion, R.J., Linehan, S.A., Zamze, S., Gordon, S., Wong, S.Y.C., 2003. Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. *J. Leukoc. Biol.* 73, 604–613.
- Mattila, J.T., Thomas, A.C., 2014. Nitric Oxide Synthase: Non-Canonical Expression Patterns. *Frontiers in Immunology* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00478>
- Matzinger, P., 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301–305. <https://doi.org/10.1126/science.1071059>
- McGee, J.O., Lewis, C.E., 1992. *The Macrophage*. Oxford ; New York : IRL Press at Oxford University Press.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A., 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 4–9.
- Michell, D., Andrews, K., P F Chin-Dusting, J., 2011. Endothelial dysfunction in hypertension: The role of arginase.
- Moncada, S., 1992. The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol. Scand.* 145, 201–227. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1992.tb09359.x>
- Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109–142.
- Mosmann, T.R., Coffman, R.L., 1987. Two types of mouse helper T-cell clone. *Immunology Today* 8, 223–227. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(87\)90171-X](https://doi.org/10.1016/0167-5699(87)90171-X)
- Mosser, D.M., 2003. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 73, 209–212.
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Mosmann, T.R. and Fowell, D.J. (2002) The Th1/Th2 paradigm in infections. In Kaufmann, S.H.E., Sher, A. and Ahmed, R. (eds.), *Immunology of infectious diseases*. ASM Press, Washington, D.C., pp. 163-174.
- Mukherjee, R., Kanti Barman, P., Kumar Thatoi, P., Tripathy, R., Kumar Das, B., Ravindran, B., 2015. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep* 5. <https://doi.org/10.1038/srep13886>

- Munder, M., 2009. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br. J. Pharmacol.* 158, 638–651. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00291.x>
- Munder, M., Mollinedo, F., Calafat, J., Canchado, J., Gil-Lamaignere, C., Fuentes, J.M., Luckner, C., Doschko, G., Soler, G., Eichmann, K., Müller, F.-M., Ho, A.D., Goerner, M., Modolell, M., 2005. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood* 105, 2549–2556. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2521>
- Murphy, C., Newsholme, P., 1998. Importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to L-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea production. *Clinical Science* 95, 397. <https://doi.org/10.1042/CS19980194>
- Niedergang, F., Chavrier, P., 2004. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 422–428. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.06.006>
- Nockher, W.A., Scherberich, J.E., 1998. Expanded CD14+ CD16+ Monocyte Subpopulation in Patients with Acute and Chronic Infections Undergoing Hemodialysis. *Infect Immun* 66, 2782–2790.
- Noorchashm, H., Noorchashm, N., Kern, J., Rostami, S.Y., Barker, C.F., Naji, A., 1997. B-Cells Are Required for the Initiation of Insulinitis and Sialitis in Nonobese Diabetic Mice. *Diabetes* 46, 941–946. <https://doi.org/10.2337/diab.46.6.941>
- Notkins, A.L., Lernmark, Å., 2001. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *J Clin Invest* 108, 1247–1252.
- Nouari, W., Ysmail-Dahlouk, L., Aribi, M., 2016. Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *International Immunopharmacology* 30, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.11.033>
- Nussler, A.K., Rénia, L., Paschetto, V., Miltgen, F., Matile, H., Mazier, D., 1993. In vivo induction of the nitric oxide pathway in hepatocytes after injection with irradiated malaria sporozoites, malaria blood parasites or adjuvants. *European Journal of Immunology* 23, 882–887. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230417>
- Ochoa, J.B., Bernard, A.C., O'Brien, W.E., Griffen, M.M., Maley, M.E., Rockich, A.K., Tsuei, B.J., Boulanger, B.R., Kearney, P.A., Morris, S.M., 2001. Arginase I expression and activity in human mononuclear cells after injury. *Ann. Surg.* 233, 393–399.
- Ohashi, P.S., 2002. T-cell signalling and autoimmunity: molecular mechanisms of disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 427–438. <https://doi.org/10.1038/nri822>
- Olmos, P., A'Hern, R., Heaton, D.A., Millward, B.A., Risley, D., Pyke, D.A., Leslie, R.D., 1988. The significance of the concordance rate for type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins. *Diabetologia* 31, 747–750.



- Olsen, C.H., 2014. Statistics in *Infection and Immunity* Revisited. *Infection and Immunity* 82, 916–920. <https://doi.org/10.1128/IAI.00811-13>
- Oswald, I.P., Wynn, T.A., Sher, A., James, S.L., 1992. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8676–8680.
- Overbergh, L., Decallonne, B., Waer, M., Rutgeerts, O., Valckx, D., Casteels, K.M., Laureys, J., Bouillon, R., Mathieu, C., 2000. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543). *Diabetes* 49, 1301–1307.
- Park, Y.S., Uddin, M.J., Piao, L., Hwang, I., Lee, J.H., Ha, H., 2016. Novel Role of Endogenous Catalase in Macrophage Polarization in Adipose Tissue [WWW Document]. *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1155/2016/8675905>
- Pedersen, A.E., Jungersen, M.B., Pedersen, C.D., 2011. Monocytes mediate shaving of B-cell-bound anti-CD20 antibodies: Monocytes mediate shaving of anti-CD20 antibodies. *Immunology* 133, 239–245. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03434.x>
- Pescovitz, M.D., Greenbaum, C.J., Krause-Steinrauf, H., Becker, D.J., Gitelman, S.E., Goland, R., Gottlieb, P.A., Marks, J.B., McGee, P.F., Moran, A.M., Raskin, P., Rodriguez, H., Schatz, D.A., Wherrett, D., Wilson, D.M., Lachin, J.M., Skyler, J.S., 2009. Rituximab, B-Lymphocyte Depletion, and Preservation of Beta-Cell Function. *New England Journal of Medicine* 361, 2143–2152. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904452>
- Pierpont, T.M., Limper, C.B., Richards, K.L., 2018. Past, Present, and Future of Rituximab—The World’s First Oncology Monoclonal Antibody Therapy. *Frontiers in Oncology* 8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00163>
- Pietro Paolo, M., Yu, S., Libman, I.M., Pietro Paolo, S.L., Riley, K., LaPorte, R.E., Drash, A.L., Mazumdar, S., Trucco, M., Becker, D.J., 2005. Cytoplasmic islet cell antibodies remain valuable in defining risk of progression to type 1 diabetes in subjects with other islet autoantibodies. *Pediatr Diabetes* 6, 184–192. <https://doi.org/10.1111/j.1399-543X.2005.00127.x>
- Pirot, P., Cardozo, A.K., Eizirik, D.L., 2008. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 52, 156–165.
- Potter, S.M., Mitchell, A.J., Cowden, W.B., Sanni, L.A., Dinauer, M., de Haan, J.B., Hunt, N.H., 2005. Phagocyte-derived reactive oxygen species do not influence the progression of murine blood-stage malaria infections. *Infect. Immun.* 73, 4941–4947. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4941-4947.2005>
- Quint, L., 2004. [Rituximab and autoimmune disorders therapy]. *Rev Med Interne* 25, 752–754. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2004.05.012>

- Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., 2007. Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes. *Cell Biochem. Biophys.* 48, 159–163.
- Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., 1998. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem. Pharmacol.* 55, 1139–1149.
- Rafiq, S., Butchar, J.P., Cheney, C., Mo, X., Trotta, R., Caligiuri, M., Jarjoura, D., Tridandapani, S., Muthusamy, N., Byrd, J.C., 2013. Comparative assessment of clinically utilized CD20-directed antibodies in chronic lymphocytic leukemia cells reveals divergent NK cell, monocyte, and macrophage properties. *J. Immunol.* 190, 2702–2711. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202588>
- Ramadan, J.W., Steiner, S.R., O'Neill, C.M., Nunemaker, C.S., 2011. The central role of calcium in the effects of cytokines on beta-cell function: Implications for type 1 and type 2 diabetes. *Cell Calcium* 50, 481–490. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.08.005>
- Randolph, G.J., Inaba, K., Robbiani, D.F., Steinman, R.M., Muller, W.A., 1999. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11, 753–761.
- Rath, M., MÃ¼ller, I., Kropf, P., Closs, E.I., Munder, M., 2014. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Frontiers in Immunology* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>
- Ravetch, J.V., 1997. Fc receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 121–125.
- Ravetch, J.V., 1994. Fc receptors: Rubor redux. *Cell* 78, 553–560. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90521-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90521-5)
- Redente, E.F., Higgins, D.M., Dwyer-Nield, L.D., Orme, I.M., Gonzalez-Juarrero, M., Malkinson, A.M., 2010. Differential polarization of alveolar macrophages and bone marrow-derived monocytes following chemically and pathogen-induced chronic lung inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 88, 159–168. <https://doi.org/10.1189/jlb.0609378>
- Redondo, M.J., Rewers, M., Yu, L., Garg, S., Pilcher, C.C., Elliott, R.B., Eisenbarth, G.S., 1999. Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type 1 diabetes: prospective twin study. *BMJ* 318, 698–702.
- Reff, M.E., Carner, K., Chambers, K.S., Chinn, P.C., Leonard, J.E., Raab, R., Newman, R.A., Hanna, N., Anderson, D.R., 1994. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83, 435–445.
- Reiling, N., Ulmer, A.J., Duchrow, M., Ernst, M., Flad, H.-D., Hauschildt, S., 1994. Nitric oxide synthase: MRNA expression of different isoforms in human monocytes/macrophages. *European Journal of Immunology* 24, 1941–1944. <https://doi.org/10.1002/eji.1830240836>

- Reis, E.S., Mastellos, D.C., Ricklin, D., Mantovani, A., Lambris, J.D., 2018. Complement in cancer: untangling an intricate relationship. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 5–18. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.97>
- Rey-Giraud, F., Hafner, M., Ries, C.H., 2012. In Vitro Generation of Monocyte-Derived Macrophages under Serum-Free Conditions Improves Their Tumor Promoting Functions. *PLOS ONE* 7, e42656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042656>
- Richardson, A., Fedoroff, S., 1997. Quantification of Cells in Culture, in: *Protocols for Neural Cell Culture*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 219–233. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2586-5\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2586-5_16)
- Riley, J.K., Sliwkowski, M.X., 2000. CD20: a gene in search of a function. *Semin. Oncol.* 27, 17–24.
- Robey, E., Allison, J.P., 1995. T-cell activation: integration of signals from the antigen receptor and costimulatory molecules. *Immunol. Today* 16, 306–310.
- Robles, D.T., Eisenbarth, G.S., 2001. Type 1A diabetes induced by infection and immunization. *J. Autoimmun.* 16, 355–362. <https://doi.org/10.1006/jaut.2000.0483>
- Rojas, J., Salazar, J., Martínez, M.S., Palmar, J., Bautista, J., Chávez-Castillo, M., Gómez, A., Bermúdez, V., 2015. Macrophage Heterogeneity and Plasticity: Impact of Macrophage Biomarkers on Atherosclerosis. *Scientifica (Cairo)* 2015, 851252. <https://doi.org/10.1155/2015/851252>
- Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C., Wagner, U., 2012. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum.* 64, 671–677. <https://doi.org/10.1002/art.33418>
- Rouzaut, A., Subirá, M.L., de Miguel, C., Domingo-de-Miguel, E., González, A., Santiago, E., López-Moratalla, N., 1999. Co-expression of inducible nitric oxide synthase and arginases in different human monocyte subsets. Apoptosis regulated by endogenous NO. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1451, 319–333. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(99\)00106-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(99)00106-8)
- Russell, M.A., Morgan, N.G., 2014. The impact of anti-inflammatory cytokines on the pancreatic  $\beta$ -cell. *Islets* 6, e950547. <https://doi.org/10.4161/19382014.2014.950547>
- Rutschman, R., Lang, R., Hesse, M., Ihle, J.N., Wynn, T.A., Murray, P.J., 2001. Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J. Immunol.* 166, 2173–2177.
- Sabat, R., Grütz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., Geginat, J., 2010. Biology of interleukin-10. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21, 331–344. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.09.002>

Sadelain, M.W., Qin, H.Y., Sumoski, W., Parfrey, N., Singh, B., Rabinovitch, A., 1990. Prevention of diabetes in the BB rat by early immunotherapy using Freund's adjuvant. *J. Autoimmun.* 3, 671–680.

Safi, W., Kuehnl, A., Nüssler, A., Eckstein, H.-H., Pelisek, J., 2016. Differentiation of human CD14<sup>+</sup> monocytes: an experimental investigation of the optimal culture medium and evidence of a lack of differentiation along the endothelial line. *Exp Mol Med* 48, e227. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.11>

Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C.R., Lanzavecchia, A., 1998. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187, 875–883.

Sanda, S., Bollyky, J., Standifer, N., Nepom, G., Hamerman, J.A., Greenbaum, C., 2010. Short-term IL-1beta blockade reduces monocyte CD11b integrin expression in an IL-8 dependent fashion in patients with type 1 diabetes. *Clin. Immunol.* 136, 170–173. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.04.009>

Sastry, K., Ezekowitz, R.A., 1993. Collectins: pattern recognition molecules involved in first line host defense. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 59–66.

Sato, Y., Hotta, N., Sakamoto, N., Matsuoka, S., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochemical Medicine* 21, 104–107. [https://doi.org/10.1016/0006-2944\(79\)90061-9](https://doi.org/10.1016/0006-2944(79)90061-9)

Satriano, J., 2004. Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. *Amino Acids* 26, 321–329. <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0078-4>

Schebesch, C., Kodelja, V., Müller, C., Hakij, N., Bisson, S., Orfanos, C.E., Goerdts, S., 1997. Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4<sup>+</sup> T cells in vitro. *Immunology* 92, 478–486.

Schindler, C., Darnell, J.E., 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 621–651. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.003201>

Seay, H.R., Yusko, E., Rothweiler, S.J., Zhang, L., Posgai, A.L., Campbell-Thompson, M., Vignali, M., Emerson, R.O., Kaddis, J.S., Ko, D., Nakayama, M., Smith, M.J., Cambier, J.C., Pugliese, A., Atkinson, M.A., Robins, H.S., Brusko, T.M., 2016. Tissue distribution and clonal diversity of the T and B cell repertoire in type 1 diabetes. *JCI Insight* 1. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.88242>

Semnani, R.T., Mahapatra, L., Moore, V., Sanprasert, V., Nutman, T.B., 2011. Functional and Phenotypic Characteristics of Alternative Activation Induced in Human Monocytes by Interleukin-4 or the Parasitic Nematode *Brugia malayi* ∇. *Infect Immun* 79, 3957–3965. <https://doi.org/10.1128/IAI.05191-11>

- Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., Pamer, E.G., 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 421–452. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326>
- Serreze, D.V., Chapman, H.D., Varnum, D.S., Hanson, M.S., Reifsnnyder, P.C., Richard, S.D., Fleming, S.A., Leiter, E.H., Shultz, L.D., 1996. B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new “speed congenic” stock of NOD.Ig mu null mice. *Journal of Experimental Medicine* 184, 2049–2053. <https://doi.org/10.1084/jem.184.5.2049>
- Serreze, D.V., Fleming, S.A., Chapman, H.D., Richard, S.D., Leiter, E.H., Tisch, R.M., 1998. B Lymphocytes Are Critical Antigen-Presenting Cells for the Initiation of T Cell-Mediated Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *The Journal of Immunology* 161, 3912–3918.
- Serreze, D.V., Silveira, P.A., 2002. The Role of B Lymphocytes as Key Antigen-Presenting Cells in the Development of T Cell-Mediated Autoimmune Type 1 Diabetes, in: Nemazee, D. (Ed.), *Current Directions in Autoimmunity*. KARGER, Basel, pp. 212–227. <https://doi.org/10.1159/000066863>
- Shalev, I., Schmelzle, M., Robson, S.C., Levy, G., 2011. Making sense of regulatory T cell suppressive function. *Semin. Immunol.* 23, 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2011.04.003>
- Shan, D., Ledbetter, J.A., Press, O.W., 2000. Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 48, 673–683.
- Shan, D., Ledbetter, J.A., Press, O.W., 1998. Apoptosis of Malignant Human B Cells by Ligation of CD20 With Monoclonal Antibodies. *Blood* 91, 1644–1652.
- Shearer, J.D., Richards, J.R., Mills, C.D., Caldwell, M.D., 1997. Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing. *Am. J. Physiol.* 272, E181-190. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1997.272.2.E181>
- Sherman, M.P., Loro, M.L., Wong, V.Z., Tashkin, D.P., 1991. Cytokine- and *Pneumocystis carinii*- induced L-arginine oxidation by murine and human pulmonary alveolar macrophages. *J. Protozool.* 38, 234S-236S.
- Sibilia, J., Sordet, C., 2005. [Rituximab: a original biotherapy in auto-immune disorders]. *Rev Med Interne* 26, 485–500. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2004.12.013>
- Sica, A., Mantovani, A., 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122, 787–795. <https://doi.org/10.1172/JCI59643>
- Siljander, H.T.A., Simell, S., Hekkala, A., Lähde, J., Simell, T., Vähäsalo, P., Veijola, R., Ilonen, J., Simell, O., Knip, M., 2009. Predictive Characteristics of Diabetes-Associated Autoantibodies Among Children With HLA-Conferred Disease Susceptibility in the General Population. *Diabetes* 58, 2835–2842. <https://doi.org/10.2337/db08-1305>

- Smith, M.R., 2003. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 22, 7359–7368. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206939>
- Spiecker, M., Darius, H., Kaboth, K., Hübner, F., Liao, J.K., 1998. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J. Leukoc. Biol.* 63, 732–739.
- Stahl, P.D., Ezekowitz, R.A., 1998. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 50–55.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., Gordon, S., 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176, 287–292.
- Stern, M., Herrmann, R., 2005. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 54, 11–29. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.10.011>
- Stolz, C., Hess, G., Hahnel, P.S., Grabellus, F., Hoffarth, S., Schmid, K.W., Schuler, M., 2008. Targeting Bcl-2 family proteins modulates the sensitivity of B-cell lymphoma to rituximab-induced apoptosis. *Blood* 112, 3312–3321. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-124487>
- Stuehr, D.J., Marletta, M.A., 1985. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7738–7742.
- Suarez-Pinzon, W.L., Rabinovitch, A., 2001. Approaches to type 1 diabetes prevention by intervention in cytokine immunoregulatory circuits. *Int. J. Exp. Diabetes Res.* 2, 3–17.
- Szablewski, L., 2014. Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Int. Immunopharmacol.* 22, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.06.033>
- Szabó, C., Southan, G.J., Wood, E., Thiemermann, C., Vane, J.R., 1994. Inhibition by spermine of the induction of nitric oxide synthase in J774.2 macrophages: requirement of a serum factor. *Br. J. Pharmacol.* 112, 355–356.
- Tamoutounour, S., Guilliams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., Dalod, M., Malissen, B., Henri, S., 2013. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39, 925–938. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.004>
- Tan, H.-Y., Wang, N., Li, S., Hong, M., Wang, X., Feng, Y., 2016. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2016/2795090>

- Taplin, C.E., Barker, J.M., 2008. Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity* 41, 11–18. <https://doi.org/10.1080/08916930701619169>
- Tedder, T.F., Engel, P., 1994. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol. Today* 15, 450–454. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90276-3](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90276-3)
- Teo, Z.P., n.d. The Role of Macrophages in Apoptosis: Initiator, Regulator, Scavenger 5.
- Thiemermann, C., Ruetten, H., Wu, C.C., Vane, J.R., 1995. The multiple organ dysfunction syndrome caused by endotoxin in the rat: attenuation of liver dysfunction by inhibitors of nitric oxide synthase. *Br. J. Pharmacol.* 116, 2845–2851.
- Thomas, H.E., Darwiche, R., Corbett, J.A., Kay, T.W.H., 2002. Interleukin-1 Plus -Interferon-Induced Pancreatic -Cell Dysfunction Is Mediated by -Cell Nitric Oxide Production. *Diabetes* 51, 311–316. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2.311>
- Tree, T.I., O’Byrne, D., Tremble, J.M., MacFarlane, W.M., Haskins, K., James, R.F., Docherty, K., Hutton, J.C., Banga, J.P., 2000. Evidence for recognition of novel islet T cell antigens by granule-specific T cell lines from new onset type 1 diabetic patients. *Clin. Exp. Immunol.* 121, 100–105.
- Trinanes, J., Salido, E., Fernandez, J., Rufino, M., Gonzalez-Posada, J.M., Torres, A., Hernandez, D., 2012. Type 1 Diabetes Increases the Expression of Proinflammatory Cytokines and Adhesion Molecules in the Artery Wall of Candidate Patients for Kidney Transplantation. *Diabetes Care* 35, 427–433. <https://doi.org/10.2337/dc11-1665>
- Trudeau, J.D., Dutz, J.P., Arany, E., Hill, D.J., Fieldus, W.E., Finegood, D.T., 2000. Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? *Diabetes* 49, 1–7.
- Tse, H.M., Milton, M.J., Piganelli, J.D., 2004. Mechanistic analysis of the immunomodulatory effects of a catalytic antioxidant on antigen-presenting cells: implication for their use in targeting oxidation-reduction reactions in innate immunity. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 233–247.
- Tugal, D., Liao, X., Jain, M.K., 2013. Transcriptional control of macrophage polarization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1135–1144. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301453>
- Turley, S., Poirot, L., Hattori, M., Benoist, C., Mathis, D., 2003. Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *J. Exp. Med.* 198, 1527–1537. <https://doi.org/10.1084/jem.20030966>
- Uchida, J., Hamaguchi, Y., Oliver, J.A., Ravetch, J.V., Poe, J.C., Haas, K.M., Tedder, T.F., 2004. The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J. Exp. Med.* 199, 1659–1669. <https://doi.org/10.1084/jem.20040119>

- Ueda, H., Howson, J.M.M., Esposito, L., Heward, J., Snook, H., Chamberlain, G., Rainbow, D.B., Hunter, K.M.D., Smith, A.N., Di Genova, G., Herr, M.H., Dahlman, I., Payne, F., Smyth, D., Lowe, C., Twells, R.C.J., Howlett, S., Healy, B., Nutland, S., Rance, H.E., Everett, V., Smink, L.J., Lam, A.C., Cordell, H.J., Walker, N.M., Bordin, C., Hulme, J., Motzo, C., Cucca, F., Hess, J.F., Metzker, M.L., Rogers, J., Gregory, S., Allahabadi, A., Nithiyanathan, R., Tuomilehto-Wolf, E., Tuomilehto, J., Bingley, P., Gillespie, K.M., Undlien, D.E., Rønningen, K.S., Guja, C., Ionescu-Tîrgoviște, C., Savage, D.A., Maxwell, A.P., Carson, D.J., Patterson, C.C., Franklyn, J.A., Clayton, D.G., Peterson, L.B., Wicker, L.S., Todd, J.A., Gough, S.C.L., 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423, 506–511. <https://doi.org/10.1038/nature01621>
- Underhill, D.M., 2007. Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. *Immunol. Rev.* 219, 75–87. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00548.x>
- Underhill, D.M., Ozinsky, A., 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 103–110.
- Vadon-Le Goff, S., Sennequier, N., 1998. Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle. *médecine/sciences* 14, 1185. <https://doi.org/10.4267/10608/936>
- van Meerten, T., van Rijn, R.S., Hol, S., Hagenbeek, A., Ebeling, S.B., 2006. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin. Cancer Res.* 12, 4027–4035. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0066>
- Vannini, F., Kashfi, K., Nath, N., 2015. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol* 6, 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.009>
- Varol, C., Landsman, L., Fogg, D.K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R., Kalchenko, V., Geissmann, F., Jung, S., 2007. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204, 171–180. <https://doi.org/10.1084/jem.20061011>
- Veal, E.A., Day, A.M., Morgan, B.A., 2007. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol. Cell* 26, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.016>
- Vincent, F., de la Salle, H., Bohbot, A., Bergerat, J.P., Hauptmann, G., Oberling, F., 1993. Synthesis and regulation of complement components by human monocytes/macrophages and by acute monocytic leukemia. *DNA Cell Biol.* 12, 415–423. <https://doi.org/10.1089/dna.1993.12.415>
- Viskari, H., Ludvigsson, J., Uibo, R., Salur, L., Marciulionyte, D., Hermann, R., Soltesz, G., Fuchtenbusch, M., Ziegler, A.-G., Kondrashova, A., Romanov, A., Kaplan, B., Laron, Z., Koskela, P., Vesikari, T., Huhtala, H., Knip, M., Hyöty, H., 2005. Relationship between the incidence of type 1 diabetes and maternal enterovirus antibodies: time trends and



geographical variation. *Diabetologia* 48, 1280–1287. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1780-9>

Voetman, A.A., Roos, D., 1980. Endogenous catalase protects human blood phagocytes against oxidative damage by extracellularly generated hydrogen peroxide. *Blood* 56, 846–852.

Vogel, D.Y.S., Glim, J.E., Stavenuiter, A.W.D., Breur, M., Heijnen, P., Amor, S., Dijkstra, C.D., Beelen, R.H.J., 2014. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology* 219, 695–703. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.05.002>

Vogelpeel, L.T.C., Baeten, D.L.P., de Jong, E.C., den Dunnen, J., 2015. Control of Cytokine Production by Human Fc Gamma Receptors: Implications for Pathogen Defense and Autoimmunity. *Front Immunol* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00079>

Walker, L.S.K., von Herrath, M., 2016. CD4 T cell differentiation in type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 183, 16–29. <https://doi.org/10.1111/cei.12672>

Wållberg, M., Cooke, A., 2013. Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Trends Immunol.* 34, 583–591. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.08.005>

Wang, J., Jiang, Z.-P., Su, N., Fan, J.-J., Ruan, Y.-P., Peng, W.-X., Li, Y.-F., Yu, X.-Q., 2013. The Role of Peritoneal Alternatively Activated Macrophages in the Process of Peritoneal Fibrosis Related to Peritoneal Dialysis. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 10369–10382. <https://doi.org/10.3390/ijms140510369>

Wang, T., Singh, B., Warnock, G.L., Rajotte, R.V., 1992. Prevention of recurrence of IDDM in islet-transplanted diabetic NOD mice by adjuvant immunotherapy. *Diabetes* 41, 114–117.

Weis, W.I., Taylor, M.E., Drickamer, K., 1998. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunological Reviews* 163, 19–34. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1998.tb01185.x>

Wen, L., Wong, F.S., Tang, J., Chen, N.Y., Altieri, M., David, C., Flavell, R., Sherwin, R., 2000. In vivo evidence for the contribution of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DQ molecules to the development of diabetes. *J. Exp. Med.* 191, 97–104.

Wenzlau, J.M., Moua, O., Sarkar, S.A., Yu, L., Rewers, M., Eisenbarth, G.S., Davidson, H.W., Hutton, J.C., 2008. SIC30A8 is a major target of humoral autoimmunity in type 1 diabetes and a predictive marker in prediabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1150, 256–259. <https://doi.org/10.1196/annals.1447.029>

Wiktor-Jedrzejczak, W., Gordon, S., 1996. Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiol. Rev.* 76, 927–947. <https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.4.927>

- Willcox, A., Richardson, S.J., Bone, A.J., Foulis, A.K., Morgan, N.G., 2009. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 155, 173–181. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03860.x>
- Williams, M.J., 2007. *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J. Immunol.* 178, 4711–4716.
- Wilson, R.M., Reeves, W.G., 1986. Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 63, 478–484.
- Wong, F.S., Wen, L., Tang, M., Ramanathan, M., Visintin, I., Daugherty, J., Hannum, L.G., Janeway, C.A., Shlomchik, M.J., 2004. Investigation of the role of B-cells in type 1 diabetes in the NOD mouse. *Diabetes* 53, 2581–2587.
- Wong, K.L., Tai, J.J.-Y., Wong, W.-C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.-H., Kourilsky, P., Wong, S.-C., 2011. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118, e16-31. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326355>
- Wong, K.L., Yeap, W.H., Tai, J.J.Y., Ong, S.M., Dang, T.M., Wong, S.C., 2012. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.* 53, 41–57. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8297-3>
- Wright, B., Zeidman, I., Greig, R., Poste, G., 1985. Inhibition of macrophage activation by calcium channel blockers and calmodulin antagonists. *Cell. Immunol.* 95, 46–53.
- Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Mathison, J.C., 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431–1433.
- Wynn, T.A., Chawla, A., Pollard, J.W., 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445–455. <https://doi.org/10.1038/nature12034>
- Xia, C.-Q., Liu, Y., Guan, Q., Clare-Salzler, M.J., 2013. Antibody-Based and Cellular Therapies of Type 1 Diabetes, in: Escher, A. (Ed.), *Type 1 Diabetes*. InTech. <https://doi.org/10.5772/53495>
- Xie, H., Zhang, B., Matsumoto, Y., Li, Q., Notkins, A.L., Lan, M.S., 1997. Autoantibodies to IA-2 and IA-2 beta in insulin-dependent diabetes mellitus recognize conformational epitopes: location of the 37- and 40-kDa fragments determined. *The Journal of Immunology* 159, 3662–3667.
- Xiong, X., Barreto, G.E., Xu, L., Ouyang, Y.B., Xie, X., Giffard, R.G., 2011. Increased brain injury and worsened neurological outcome in interleukin-4 knockout mice after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 42, 2026–2032. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.593772>
- Xiu, Y., Wong, C.P., Bouaziz, J.D., Hamaguchi, Y., Wang, Y., Pop, S.M., Tisch, R.M., Tedder, T.F., 2008. B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes

in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in FcγR effector functions. *J. IMMUNOL.*, Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 180, 2863–2875.

Xu, F., Kang, Y., Zhang, H., Piao, Z., Yin, H., Diao, R., Xia, J., Shi, L., 2013. Akt1-mediated regulation of macrophage polarization in a murine model of *Staphylococcus aureus* pulmonary infection. *J. Infect. Dis.* 208, 528–538. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit177>

Xu, X., Shi, Y., Cai, Y., Zhang, Q., Yang, F., Chen, H., Gu, Y., Zhang, M., Yu, L., Yang, T., 2013. Inhibition of increased circulating Tfh cell by anti-CD20 monoclonal antibody in patients with type 1 diabetes. *PLoS ONE* 8, e79858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079858>

Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., Wang, H., 2014. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research* 2, 1. <https://doi.org/10.1186/2050-7771-2-1>

Yang, L., Luo, S., Huang, G., Peng, J., Li, X., Yan, X., Lin, J., Wenzlau, J.M., Davidson, H.W., Hutton, J.C., Zhou, Z., 2010. The diagnostic value of zinc transporter 8 autoantibody (ZnT8A) for type 1 diabetes in Chinese. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 26, 579–584. <https://doi.org/10.1002/dmrr.1128>

Yang, L.-J., 2008. Big mac attack: does it play a direct role for monocytes/macrophages in type 1 diabetes? *Diabetes* 57, 2922–2923. <https://doi.org/10.2337/db08-1007>

Yang, X.D., Michie, S.A., Mebius, R.E., Tisch, R., Weissman, I., McDevitt, H.O., 1996. The role of cell adhesion molecules in the development of IDDM: implications for pathogenesis and therapy. *Diabetes* 45, 705–710.

Yang, Z., Ming, X.-F., 2014. Functions of Arginase Isoforms in Macrophage Inflammatory Responses: Impact on Cardiovascular Diseases and Metabolic Disorders. *Front. Immunol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00533>

Yoon, J.-W., Jun, H.-S., 2005. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am J Ther* 12, 580–591.

Ysmail-Dahlouk, L., Nouari, W., Aribi, M., 2016. 1,25-dihydroxyvitamin D3 down-modulates the production of proinflammatory cytokines and nitric oxide and enhances the phosphorylation of monocyte-expressed STAT6 at the recent-onset type 1 diabetes. *Immunology Letters, Innate Lymphoid Cells in normal and disease* 179, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.10.002>

Zhai, Z., Solco, A., Wu, L., Wurtele, E.S., Kohut, M.L., Murphy, P.A., Cunnick, J.E., 2009. Echinacea increases arginase activity and has anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophage cells, indicative of alternative macrophage activation. *Journal of Ethnopharmacology* 122, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.11.028>

Zhou, X., Hu, W., Qin, X., 2008. The role of complement in the mechanism of action of rituximab for B-cell lymphoma: implications for therapy. *Oncologist* 13, 954–966. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0089>

Zhu, H., Jia, Z., Zhang, L., Yamamoto, M., Misra, H.P., Trush, M.A., Li, Y., 2008. Antioxidants and phase 2 enzymes in macrophages: regulation by Nrf2 signaling and protection against oxidative and electrophilic stress. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 233, 463–474. <https://doi.org/10.3181/0711-RM-304>

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J.M., Lutz, M.B., 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74-80. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>

Zimmet, P., 1996. Antibodies to glutamic acid decarboxylase in the prediction of insulin dependency. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 34 Suppl, S125-131.

## RÉSUMÉ

**Introduction :** Les monocytes (MOs) sont les principales cellules phagocyte mononucléaire innée du sang et l'une des cellules effectrices les plus importantes exprimant le récepteur Fc $\gamma$ , ce qui est crucial pour l'interaction avec le domaine Fc des anticorps. Ainsi, nous avons évalué l'effet du Rituximab (RTX), un anticorps monoclonal humain (AcM) chimérique anti-CD20, sur les activités fonctionnelles des monocytes au début de l'apparition du diabète de type 1 (DT1) humain.

**Méthodes:** Les monocytes ont été isolés à partir des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) obtenues à partir de patients volontaires avec un DT1 récent et des donneurs témoins sains.

**Résultats:** Les niveaux de production d'interleukine 6 (IL-6) étaient significativement augmentés chez les patients atteints de DT1 par rapport aux monocytes des témoins en bonne santé ( $p < 0,05$ ). De même, les taux d'IL-1 $\beta$ , d'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), de lactate déshydrogénase (LDH) et d'ions de calcium intracellulaires libres ( $Ca^{2+}$ ) ont montré une augmentation chez les monocytes des patients DT1 en comparaison avec les monocytes des témoins sains, ainsi que pour la phagocytose et la capacité de destruction des agents pathogènes, mais la différence n'a pas atteint un niveau significatif. Inversement, les niveaux de production d'IL-4 et de l'activité de la catalase étaient diminués chez les patients atteints de DT1 par rapport aux monocytes des témoins sains, mais la différence n'était pas significative pour l'activité de la catalase (respectivement  $p < 0,01$  et  $p > 0,05$ ). De plus, le traitement avec le RTX a légèrement augmenté la phagocytose et les niveaux de capacité de destruction des pathogènes (respectivement,  $p < 0,05$  et  $p > 0,05$ ), a nettement diminué la libération d'IL-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ), d'IL-6, du  $Ca^{2+}$ , du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), et légèrement réduit l'activité de l'oxyde nitrique synthase (NOS), le rapport d'activité NOS à l'arginase, la cytotoxicité à base de LDH, la production d'IFN- $\gamma$ . De plus, le traitement par RTX augmente significativement la production d'IL-4 ( $p < 0,05$ ), d'IL-10 ( $p < 0,01$ ) ainsi que l'activité de la catalase ( $p < 0,05$ ).

**Conclusions:** Notre étude a montré pour la première fois que le RTX peut inverser les activités fonctionnelles anormales des monocytes ainsi que leur production de cytokines pro-inflammatoires au début du DT1. D'un point de vue thérapeutique, le RTX pourrait être suggéré au début du DT1 pour immunomoduler l'immunité innée et les conditions inflammatoires.

**Mots-clés:** activités fonctionnelles des monocytes, phagocytose et capacités de destruction, cytokines proinflammatoires et anti-inflammatoires/régulatoires, burst respiratoire, Rituximab, diabète de type 1.

## ABSTRACT

**Background:** Monocytes are the main blood innate mononuclear phagocyte and one of the most important effector cells expressing Fc $\gamma$  receptor, which is critical for the interaction with Fc domain of antibodies. Therefore, we evaluated the effect of Rituximab (RTX, a chimeric human anti-CD20 monoclonal antibody) on the functional activities of monocytes (MOs) at the onset of human type 1 diabetes (T1D).

**Methods:** MOs were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from volunteer patients with recent-onset T1D and healthy control donors.

**Results:** The levels of the production of IL-6 were significantly increased in MOs from patients with T1D when compared to MOs from healthy controls ( $p < 0.05$ ). Similarly, interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), lactate dehydrogenase (LDH) and intracellular free calcium ion ( $Ca^{2+}$ ) levels were increased in T1D MOs than in control MOs, as well as of both phagocytosis and killing capacities, but the difference did not reach a significant level. Conversely, the production levels of IL-4 and catalase activity were decreased in MOs of T1D patients compared to MOs from healthy controls, but the difference was not significant for catalase activity (respectively,  $p < 0.01$  and  $p > 0.05$ ). Additionally, treatment with RTX slightly upregulated phagocytosis and killing capacity levels (respectively,  $p < 0.05$  and  $p > 0.05$ ), markedly downregulated the release of IL-1 $\beta$  ( $p < 0.05$ ), IL-6,  $Ca^{2+}$ , hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and slightly downregulated the nitric oxide synthase (NOS) activity, NOS activity-to-arginase activity ratio, LDH-based cytotoxicity, the production of IFN- $\gamma$ . Moreover, RTX treatment significantly upregulated the production of IL-4 ( $p < 0.05$ ), IL-10 ( $p < 0.01$ ) as well as the catalase activity ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** Our study has shown for the first time that RTX can reverse the abnormal functional activities of MOs as well as their production of proinflammatory cytokines at the onset of T1D. From a therapeutic point of view, RTX may potentially be suggested at the beginning of T1D to immunomodulate innate immunity and inflammatory conditions.

**Keywords:** functional activities of monocyte, phagocytosis and killing capacities, proinflammatory and anti-inflammatory/regulatory cytokines, respiratory burst, rituximab, type 1 diabetes.

ملخص

مقدمة: Monocytes هي خلايا بلعمية وحيدة النواة الرئيسية للدم وواحدة من أهم الخلايا المستجيبة التي تعبر عن مستقبل Fc $\gamma$ ، وهو أمر حاسم للتفاعل مع مجال Fc للأجسام المضادة. ولذلك، قمنا بتقييم تأثير ريتوكسيماب (RTX)، وهو جسم حيوي أحادي النسيلة مضاد لـ CD20 على الأنشطة الوظيفية للخلايا ودية النواة (MOs) في بداية مرض السكري من النوع 1 (T1D).

طرق: تم عزل الخلايا أحادية النواة من خلايا الدم أحادية النواة المحيطية (PBMCs) التي تم الحصول عليها من المرضى داء السكري من النوع الأول المتطوعين والمتبرعين الأصحاء.

النتائج: تم زيادة مستويات إنتاج IL-6 بشكل ملحوظ في المرضى الذين يعانون من داء السكري من النوع الأول مقارنة مع الخلايا أحادية النواة في الضوابط الصحية ( $p > 0.05$ ). وبالمثل، مستويات انترلوكين 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )، انترفيرون  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )، لاكتات ديهيدروجيناز (LDH) وأيونات الكالسيوم داخل الخلايا ( $Ca^{2+}$ ) أظهرت زيادة في الخلايا أحادية النواة من مرضى داء السكري من النوع الأول مقارنة الخلايا أحادية النواة صحية الضوابط، وكذلك البلعمة والقدرة على تدمير مسببات الأمراض، ولكن الفرق لم يصل إلى مستوى كبير. وعلى العكس من ذلك، انخفضت مستويات إنتاج IL-4 والنشاط الكاتلاز في المرضى الذين يعانون من داء السكري من النوع الأول مقارنة مع الخلايا أحادية النواة في الضوابط الصحية، ولكن الفرق لم يكن كبيراً لنشاط الكاتلاز (على التوالي  $p > 0.05$  و  $p < 0.01$ ). بالإضافة إلى ذلك، زاد العلاج مع RTX زيادة البلعمة بشكل طفيف ومستويات قدرة قتل الممرض ( $p > 0.05$  و  $p < 0.05$ ، على التوالي)، انخفض بشكل كبير IL-1 $\beta$  ( $p > 0.05$ )، IL-6،  $Ca^{2+}$ ، بيروكسيد الهيدروجين ( $H_2O_2$ )، وانخفاض النشاط قليلاً من سينسيز أكسيد النيتريك (NOS)، ونسبة النشاط NOS إلى arginase، السمية الخلوية المستندة إلى LDH، إنتاج IFN- $\gamma$ . وبالإضافة إلى ذلك، والمعاملة مع RTX زيادة كبيرة في إنتاج IL-4 ( $p > 0.05$ )، IL-10 ( $p > 0.01$ ) وكذلك نشاط الكاتلاز ( $p > 0.05$ ).

الاستنتاجات: أظهرت دراستنا لأول مرة أن RTX يمكن عكس الأنشطة الوظيفية غير طبيعية من الخلايا أحادية النواة وكذلك إنتاجها من السيتوكينات الموالية للالتهابات في بداية داء السكري من النوع الأول. من وجهة نظر علاجية، يمكن اقتراح RTX في بداية داء السكري من النوع الأول ليعيد المناعة الفطرية والظروف الالتهابية. الكلمات الرئيسية: الأنشطة الوظيفية للخلايا ودية ال نواة، البلعمة والقدرات القتالية، السيتوكينات المسببة للالتهاب والمضادة للالتهابات / التنظيمية، انفجار تنفسي، ريتوكسيماب، داء السكري من النوع الأول